

明 細 書

OmpTプロテアーゼ変異体を用いたポリペプチドの切断方法

技術分野

本発明は大腸菌が有するOmpTプロテアーゼ又はその変異体を利用して生理活性ペプチド、タンパク質及びそれらの誘導体を融合タンパク質から直接切出す方法に関する。詳細には大腸菌成熟型OmpTプロテアーゼを用いる融合タンパク質の切断において、切断部位のP3位、P4位及びP5位に塩基性アミノ酸を配することにより当該切断部位のP1位とP1'位の間のペプチド結合における切断率を上昇させる方法、更に、OmpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸を置換してそのP1'位に対する基質特異性を改変した変異体を用い、P1'位のアミノ酸がアルギニン又はリジン以外である場合においても融合タンパク質から生理活性ペプチド、タンパク質及びそれらの誘導体を効率よく遊離、生産する方法に関する。

背景技術

大腸菌OmpTプロテアーゼは大腸菌外膜面分に存在し、主に塩基性アミノ酸対の間のペプチド結合を選択的に切断するプロテアーゼである。この大腸菌OmpTプロテアーゼのアミノ酸配列と相同性を有し且つプロテアーゼ活性を有するあるいは有すると推定されるタンパク質は、Salmonella、Yersinia、Shigella等の腸内細菌にも見出されており、これら一群のタンパク質はomptin familyと称されている。

大腸菌OmpTプロテアーゼは分子量約33500である。Sugimura等はOmpTプロテアーゼについて、基質特異性を調べ、本酵素がアルギニ

ン-アルギニン、リジン-リジン、アルギニン-リジン及びリジン-アルギニンの塩基性アミノ酸対の中央のペプチド結合を特異的に切断する酵素であることを報告している (Sugimura, K. and Nishihara, T. J. Bacteriol. 170: 5625-5632, 1988)。

しかしながら本酵素は全ての塩基性アミノ酸対を切断するわけではなく、むしろその特異性は高い。例えばヒトガンマインターフェロンには塩基性アミノ酸対が10箇所存在するが、それらのうちで2箇所のみが切断される (Sugimura, K. and Higashi, N. J. Bacteriol. 170: 3650-3654, 1988)。これは基質であるヒトガンマインターフェロンの立体構造や塩基性アミノ酸対周辺の酵素が認識すると思われる部位のアミノ酸配列の影響によると思われる。

本明細書においてはSchechterとBergerの表記方法 (Schechter, I. and Berger, A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 27: 157-162, 1967) に従って基質のアミノ酸の位置を表記した。即ち、 $P_n \cdots P_2 - P_1 - P_1' - P_2' \cdots P_n'$ においてP1位とP1' 位の間のペプチド結合が切断部位であり、アミノ酸は1文字あるいは3文字表記とし、↓を切断部位とした。

例えば、アミノ酸配列-ロイシン-チロシン-リジン-アルギニン-ヒスチジン-のリジンとアルギニンの間で切断される場合 (-Leu-Tyr-Lys↓Arg-His-)、ロイシンがP3位、チロシンがP2位、リジンがP1位、アルギニンがP1' 位、ヒスチジンがP2' 位のアミノ酸となる。

更に、切断部位及びその周辺アミノ酸配列にアミノ酸置換を導入して切断を受けなくなった場合又は新たな切断部位が生じる場合においても、特に断りのない限り、もとの配列上の対応するアミノ酸の位置としてこれらを用いることとする。

これまでに塩基性アミノ酸対以外のアミノ酸配列における0mpTプ

ロテアーゼ切断部位も見出されており、DekkerらはAla-Arg-Arg-Ala (P2-P1↓P1'-P2')のアミノ酸配列からなるOmpTプロテアーゼ基質にアミノ酸置換を導入した基質を用いて、OmpTプロテアーゼが切断部位のP1位のアミノ酸として塩基性アミノ酸であるアルギニン及びリジンに対して高い特異性を示す一方で、P1'位のアミノ酸に関しては寛容であることを報告している (Dekker, N. et al. *Biochemistry* 40: 1694-1701, 2001)。

本発明者らも、尿素存在ポリペプチド変性条件下において本酵素が切断できる融合タンパク質のP1'位にアミノ酸置換を導入した融合タンパク質を基質に用いて、P1'位のアミノ酸がアスパラギン酸、グルタミン酸、及びプロリン以外のアミノ酸である場合に切断されることを見出している (Okuno, K. et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 127-134, 2002、特願2000-602803)。但し、これらの場合において切断効率はP1'位アミノ酸残基がアルギニン又はリジンである場合と比較して低い。

切断部位周辺配列に対する特異性に関してはP2位又はP2'位に酸性アミノ酸を配した場合に切断を受けなくなることが示されている (Dekker, N. et al. *Biochemistry* 40: 1694-1701, 2001)。

更に、本発明者らはP4位又はP6位に塩基性アミノ酸であるアルギニン又はリジンを配した場合に切断効率が増加し、逆に酸性アミノ酸であるアスパラギン酸又はグルタミン酸を配した場合にはそれが減少することを報告している (Okuno, K. et al. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36: 77-84, 2002、特願2000-602803)。

その他の切断部位周辺配列に対する特異性に関しては明らかとなっていないがOmpTプロテアーゼは塩基性の高い抗菌ペプチドであるプロタミンを切断すること (Stumpe, S. et al. *J. Bacteriol.* 180: 4002-4006, 1998)、プロテアーゼ活性に関わるOmpTプロテアー

ぜ菌体外ドメインに酸性アミノ酸が多く存在すること (Vandeputte-Rutten, L. et al. EMBO J. 20: 5033-5039, 2001)からOmpTプロテアーゼと基質間の相互作用には電荷による作用が重要であろうと推測される。

OmpTプロテアーゼの応用面に関して、切断部位に対する特異性の高さ、更には大腸菌外膜に存在しているプロテアーゼであることより、本プロテアーゼは遺伝子組換え技術で作製した融合タンパク質から目的ポリペプチドを遊離させる際にプロセッシング酵素として用いられている。

Hankeらは大腸菌を用いたコレステロールエステラーゼの分泌生産にあたり、それを大腸菌ヘモリシンAタンパク質と融合させて菌体外に分泌させた後、外膜に存在しているOmpTプロテアーゼを作用させて融合タンパク質から活性あるコレステロールエステラーゼを得ることに成功している。彼らは、アルギニン-リジンの配列を持つリンカーを配し、この配列をOmpTプロテアーゼで切断している。(Hanke, C. et al. Mol. Gen. Genet. 233: 42-48, 1992)。

また、本発明者等はOmpTプロテアーゼが変性剤に対して抵抗性があることを見出し、この性質を利用することで封入体として発現された融合タンパク質を変性剤の存在下で切断できることを示した。即ち、大腸菌発現系で封入体としてStaphylococcus aureus V8プロテアーゼ誘導体融合タンパク質を発現し、それを尿素により可溶化した後、尿素存在下でOmpTプロテアーゼを働かせ、融合タンパク質からV8プロテアーゼ誘導体部分を遊離し、リフォールディングを行ない、酵素活性を有するV8プロテアーゼ誘導体を生産することに成功している(Yabuta, M. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 118-125, 1995)。

通常、融合タンパク質から目的ポリペプチドあるいは目的タンパ

ク質を遊離させる際には、アミノ酸配列に対する特異性の高い酵素がプロセッシング酵素としてよく用いられている。それらに使われるプロテアーゼには、Xa因子、トロンビン、エンテロキナーゼ等が知られているが、これらの酵素は哺乳類を起源とする酵素であり、その供給量は低く、コストが高いため、融合タンパク質法によるペプチド及びタンパク質の工業的大量処理には適していない。更には目的ポリペプチド、タンパク質を医薬品として用いる際には、酵素に由来するウイルス汚染及び狂牛病の原因因子である変性プリオンタンパク質の汚染についても考慮することが必要である。

0mpTプロテアーゼは大腸菌に起源を持つことから、プロセッシング酵素として用いるとき供給量、コスト及び安全性の面において前述の酵素より優れていることは明白である。また、0mpTプロテアーゼは封入体中にも存在するため融合タンパク質を封入体として発現させる場合には尿素などの変性剤により融合タンパク質を溶解するだけで作用する。更に、0mpTプロテアーゼは大腸菌外膜に存在するため菌体そのものを反応系に添加することにより0mpTプロテアーゼ反応を行なうことができる (Grodberg, J. and Dunn, J. J. J. Bacteriol. 170: 1245-1253)。

医薬品製造などの工業的ペプチド生産において大腸菌で生産された融合タンパク質をプロセッシングして目的ポリペプチドを得る際に用いるプロテアーゼの多くは大腸菌由来ではないために精製して使用する必要がある。そのため精製を必要とせず、大腸菌菌体そのもの、外膜画分の添加あるいは封入体溶解のみで0mpTプロテアーゼをプロセッシングプロテアーゼとして使用することはポリペプチド生産コストの大幅な改善に寄与する。しかし従来大腸菌0mpTプロテアーゼを用いた融合タンパク質のプロセッシングにおいて遊離されてくるポリペプチドのN末端アミノ酸は一部の例外を除きリジンあ

るいはアルギニンであるものに限られていた。

OmpTプロテアーゼの有用性は大きいが、本発明以前は、OmpTプロテアーゼを融合タンパク質の切断酵素として用いる場合、切断部位及びその周辺のアミノ酸配列をどのようにデザインすれば意図する部位で特異的且つ効率的な切断が可能なのかということに関する知見は限られていた。そのため、効率的に切断可能な目的ポリペプチドのN末端アミノ酸の種類は限定されていた。従って、得ることのできる目的ポリペプチドの種類が制限されるあるいは、たとえ切断可能であっても効率的な切断が行えないという問題が生じていた。

特許文献1：特願2000-602803

非特許文献1：Sugimura, K. and Nishihara, T. J. Bacteriol. 170: 5625-5632, 1988

非特許文献2：Sugimura, K. and Higashi, N. J. Bacteriol. 170: 3650-3654, 1988

非特許文献3：Schechter, I. and Berger, A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 27: 157-162, 1967

非特許文献4：Dekker, N. et al. Biochemistry 40: 1694-1701, 2001

非特許文献5：Okuno, K. et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 127-134, 2002

非特許文献6：Okuno, K. et al. Biotechnol. Appl. Biochem. 36: 77-84, 2002

非特許文献7：Stumpe, S. et al. J. Bacteriol. 180: 4002-4006, 1998

非特許文献8：Vandeputte-Rutten, L. et al. EMBO J. 20: 5033-5039, 2001

非特許文献9：Hanke, C. et al. Mol. Gen. Genet. 233: 42-

48, 1992

非特許文献 10 : Yabuta, M. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 118-125, 1995

非特許文献 11 : Grodberg, J. and Dunn, J. J. Bacteriol. 170: 1245-1253, 1988

発明の開示

本発明においては上記の問題点を克服し、プロセッシング酵素としてOmpTプロテアーゼ若しくはその変異体を利用してあらゆる種類の目的ポリペプチドを融合タンパク質から効率的且つ特異的に遊離する方法、即ち、目的ポリペプチドのN末端アミノ酸をP1'位アミノ酸残基として融合タンパク質のP1-P1'の1箇所のみを効率よく切断させることを本発明の課題とする。

上述の課題に対し本発明者らは、OmpTプロテアーゼの切断部位及びその周辺アミノ酸配列を更に調べ、新たな切断方法や認識・切断配列を見出せば、上記のこれらの制限を解決することができ、本酵素が融合タンパク質のプロセッシング酵素として更に有用となると考えた。また、OmpTプロテアーゼ自体に部位特異的変異を導入して基質特異性が野生型と異なるOmpTプロテアーゼ変異体を作製し、これを利用することも可能であると考えた。

そこで本発明者らは、OmpTプロテアーゼの基質認識及び切断には切断部位周辺のアミノ酸配列が重要であることから、既知の切断部位を利用し、切断部位及びその周辺アミノ酸配列を検討することにより新たな基質特異性を見出し、これを融合タンパク質の切断に応用するために鋭意検討を行なった。

本発明において「OmpTプロテアーゼ」とは、シグナルペプチドが除かれた後の大腸菌由来の成熟型OmpTプロテアーゼ又は当該OmpTプ

ロテアーゼ以外のOmpTプロテアーゼ活性を有するタンパク質（OmpT様プロテアーゼ）を意味する。OmpT様プロテアーゼとしては、（1）*Yersinia pestis* plasminogen activator、（2）*Salmonella typhimurium* E protein、（3）*Escherichia coli*及び（4）*Shigella flexneri* SopA等が挙げられる。

本発明において「OmpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体」とは、上記OmpTプロテアーゼの97番目のアスパラギン酸（Asp⁹⁷）を他のアミノ酸で置換したOmpTプロテアーゼ変異体又は上記OmpT様プロテアーゼのアミノ酸配列中で上記OmpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸に相当するアミノ酸を置換した変異体（OmpT様プロテアーゼ97番相当アミノ酸変異体）を意味する。

OmpTプロテアーゼの97番目のアスパラギン酸を置換する他のアミノ酸としては、例えば、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンを挙げることができる。また、OmpT様プロテアーゼ97番相当アミノ酸変異体としては、上記OmpT様プロテアーゼのうち、（1）*Yersinia pestis* plasminogen activatorについては117位（シグナルペプチドを含む全アミノ酸配列におけるN末端からのアミノ酸残基数で示した）。

OmpTの場合同様にシグナルペプチドを含んだアミノ酸残基数で示すと97番目アミノ酸は117位となる）のアスパラギン酸を、（2）*Salmonella typhimurium* E proteinについては134位のアスパラギン酸を、（3）*Escherichia coli* OmpPについては117位のアスパラギン酸を、及び（4）*Shigella flexneri* SopAについては117位のアスパラギン酸を例えばアラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンに置換したもの等が挙げられる

。本発明において「目的ペプチド」とは、最終的に得たいペプチドのみならず、融合タンパク質から0mpTプロテアーゼ等で切断後、更に修飾反応や切断反応を受ける製造中間体（所謂、前駆体ペプチド）をも含む意味で用いられる。

本発明において「保護ペプチド」とは、目的ペプチドとリンカーペプチドを介して融合タンパク質を構成するペプチドであって、リンカーペプチドをも含む意味で用いられる。

本発明において「所望する切断部位」とは、ポリペプチド中の任意の部位、保護ペプチドとリンカーペプチドを介して融合した目的ペプチドからなる融合タンパク質におけるリンカーペプチドのC末端と目的ペプチドのN末端との間の部位又は当該リンカーペプチド中の任意の部位を意味する。

本発明の主な主題は以下の（１）～（４）の事項に関する。：

（１）ポリペプチド中の所望する切断部位に係るP1位がアルギニン又はリジンであり、P1'位がアスパラギン酸、グルタミン酸又はプロリン以外であり、P10位からP3位まで又はP3'位からP5'位までのアミノ酸配列中の任意の部位に１つの塩基性アミノ酸又は２つ若しくは３つの塩基性アミノ酸を連続して配し（但し、１つの塩基性アミノ酸を配する場合、P6又はP4位を除く）、0mpTプロテアーゼを用いて当該ポリペプチド中の所望する切断部位で切断することを特徴とするポリペプチドの切断方法、及び当該切断方法を用いて融合タンパク質から目的ペプチドを得ることを特徴とする目的ペプチドの製造方法、

（２）0mpTプロテアーゼ 97 番アミノ酸変異体を用いてポリペプチド中の所望の切断部位で切断することを特徴とするポリペプチドの切断方法、及び当該切断方法を用いて融合タンパク質から目的ペ

プチドを得ることを特徴とする目的ペプチドの製造方法、

(3) ポリペプチド中の所望する切断部位に係るP1位がアルギニン又はリジンであり、P1' 位がアルギニン又はリジン以外であり、P10位からP3位まで又はP3' 位からP5' 位までのアミノ酸配列中の任意の部位に1つの塩基性アミノ酸又は2つ若しくは3つの塩基性アミノ酸を連続して配することからなる上記(2)に記載の方法、

(4) 0mpTプロテアーゼ又は0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いてポリペプチド中の所望する切断部位で切断することからなるポリペプチドの切断方法であって、当該ポリペプチド中に上記プロテアーゼによる切断を所望しない部位が存在する場合、当該部位に係るP3位に酸性アミノ酸を配することにより当該部位における切断を抑制することを特徴とするポリペプチドの切断方法、及び当該切断方法を用いて融合タンパク質から目的ペプチドを得ることを特徴とする目的ペプチドの製造方法。

上記(1)については、0mpTプロテアーゼの切断部位の好ましくはP10位からP3位(但し、P6又はP4位の1箇所のみを塩基性アミノ酸で置換した場合を除く)、特に好ましくはP5位からP3位のアミノ酸を塩基性アミノ酸に置換することにより切断率が増加するという新しい知見に基づいている。しかしながら、連続する塩基性アミノ酸の間のペプチド結合を0mpTが切断しやすいという性質があるためP5位からP3位に連続する塩基性アミノ酸を配した場合、これらの部位のペプチド結合が0mpTにより切断されてしまう。

ところが3連続するアルギニンに対する0mpTの切断率は2連続する場合に比べて減少するという既知の性質を用いて、P5位からP3位に3連続するアルギニンを配した場合にはP5位からP3位のアルギニンの間での切断を抑えることができた。すなわちこれにより所望の部位での切断(P1位とP1' 位のアミノ酸の間での切断)を促進し、所

望しない部位での切断(P5位からP3位のアミノ酸の間での切断)を抑制することができた。

以上のことから、切断所望部位のP3位、P4位及びP5位に塩基性アミノ酸（好ましくは、アルギニン）を配したアミノ酸配列を所望のポリペプチド中に設計し、当該ポリペプチド中の所望する切断部位のP1'位が従来のアルギニン又はリジンの場合のみならず、アスパラギン酸、グルタミン酸又はプロリンを除くその他のアミノ酸の場合にもOmpTプロテアーゼにより非常に効率的に切断を行なえることを見出した。

更に当該方法は、目的ポリペプチドを含む融合タンパク質を大腸菌宿主で製造させ、大腸菌が本来持っている又は遺伝子工学的に導入したOmpTプロテアーゼで融合タンパク質から所望する切断部位のP1'位からC末端側に配されたN末端アミノ酸がアスパラギン酸、グルタミン酸又はプロリン以外である目的ポリペプチドを切出す場合に特に都合がよい。

また、上記（2）及び（3）については、OmpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸を特定のアミノ酸に置換した場合、OmpTプロテアーゼでは切断することができない切断部位においても実際に切断できることを見出したことは、目的ペプチドの製造において当該ペプチドのN末端アミノ酸の種類を多様に選択できるので非常に有用性が高い。特に、融合タンパク質を用いた目的ペプチドの製法において、融合タンパク質に係るリンカー配列を-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-目的ペプチドと設計し、且つOmpTプロテアーゼのN末端から97番目のアスパラギン酸を特に好ましくはロイシン、メチオニン又はヒスチジンに置換したプロテアーゼ変異体をプロセッシングプロテアーゼとして利用することにより遊離されてくるポリペプチドのN末端アミノ酸がリジンあるいはアルギニンであるもの以外でも効

率よく且つ特異的に遊離を可能にすることができる。

本願に係る実施例においては、大腸菌由来OmpTプロテアーゼの変異体を用いた融合タンパク質の切断を実施したが、OmpTプロテアーゼ以外のOmpTプロテアーゼ活性を有するもの又はそのアミノ酸配列中でOmpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸に相当するアミノ酸を置換した変異体を用いて融合タンパク質を切断することも十分に可能であると考えられる。

更に、上記(4)については、ポリペプチド又は融合タンパク質中にOmpTプロテアーゼ及びその変異体による切断を所望しない部位が存在する場合、当該部位に係るP3位に酸性アミノ酸を配することにより当該部位における切断を抑制することを見出した。この知見は特に融合タンパク質から目的ペプチドを得る際の融合タンパク質の設計において有用であり、目的ペプチドの製造を非常に効率よく行なうことができる。

更に具体的には本発明は以下の事項に関する。

(1) ポリペプチド中の所望する切断部位に係るP1位がアルギニン又はリジンであり、P1'位がアスパラギン酸、グルタミン酸又はプロリン以外であり、P10位からP3位まで又はP3'位からP5'位までのアミノ酸配列中の任意の部位に1つの塩基性アミノ酸又は2つ若しくは3つの塩基性アミノ酸を連続して配し(但し、1つの塩基性アミノ酸を配する場合、P6又はP4位を除く)、OmpTプロテアーゼを用いて当該ポリペプチド中の所望する切断部位で切断することを特徴とするポリペプチドの切断方法。

(2) 所望する切断部位を介してC末端がアルギニン又はリジンである保護ペプチドと融合したN末端がアスパラギン酸、グルタミン酸又はプロリン以外である目的ペプチドからなる融合タンパク質中の当該切断部位に係るP10位からP3位まで又はP3'位からP5'位

までのアミノ酸配列中の任意の部位に1つの塩基性アミノ酸又は2つ若しくは3つの塩基性アミノ酸を連続して配し（但し、1つの塩基性アミノ酸を配位する場合、P6又はP4位を除く）、上記切断部位が0mpTプロテアーゼにより切断されうる切断部位である融合タンパク質をコードする遺伝子を有する発現プラスミドにより宿主細胞を形質転換し、当該細胞内において上記遺伝子を発現させ、上記切断部位において上記プロテアーゼで切断されることにより融合タンパク質から目的ペプチドを得ることを特徴とする目的ペプチドの製造方法。

(3) ポリペプチド中又は融合タンパク質中に0mpTプロテアーゼによる切断を所望しない部位が存在する場合、当該部位に係るP3位に酸性アミノ酸を配することにより当該部位における切断を抑制することからなる上記(1)又は(2)に記載の方法。

(4) ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP10位～P3位の間に2又は3連続して塩基性アミノ酸を配することからなる上記(1)～(3)のいずれか1項に記載の方法。

(5) ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP5位～P3位に3連続して塩基性アミノ酸を配することからなる上記(4)に記載の方法。

(6) 塩基性アミノ酸がアルギニン及び／又はリジンである上記(1)～(5)のいずれか1項に記載の方法。

(7) 塩基性アミノ酸がアルギニンである上記(6)に記載の方法。

(8) 0mpTプロテアーゼを用いて、ポリペプチド中の所望する切断部位で切断することからなるポリペプチドの切断方法又は融合タンパク質中の所望する切断部位で切断することからなる目的ペプチドの製造方法であって、当該ポリペプチド中又は当該融合タンパク

質中に0mpTプロテアーゼによる切断を所望しない部位が存在する場合、当該部位に係るP3位に酸性アミノ酸を配することにより当該部位における切断を抑制することを特徴とする当該方法。

(9) 酸性アミノ酸がアスパラギン酸である上記 (3) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の方法。

(10) ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP5位からP1位までのアミノ酸配列がArg-Arg-Arg-Ala-Argである上記 (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の方法。

(11) ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP7位からP1位までのアミノ酸配列がAsp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Argである上記 (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の方法。

(12) 0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いてポリペプチド中の所望の切断部位で切断することを特徴とするポリペプチドの切断方法。

(13) ポリペプチド中の所望する切断部位に係るP1位がアルギニン又はリジンであり、P1' 位がアルギニン又はリジン以外である場合に、0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いて当該ポリペプチド中の所望の切断部位で切断することを特徴とするポリペプチドの切断方法。

(14) ポリペプチド中の所望する切断部位に係るP1位がアルギニン又はリジンであり、P1' 位がアルギニン又はリジン以外であり、

P10位からP3位まで又はP3'位からP5'位までのアミノ酸配列中の任意の部位に1つの塩基性アミノ酸又は2つ若しくは3つの塩基性アミノ酸を連続して配し、0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いて当該ポリペプチド中の所望する切断部位で切断することを特徴とするポリペプチドの切断方法。

(15) 所望する切断部位において、0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体により切断されうる切断部位を介して保護ペプチドと融合した目的ペプチドからなる融合タンパク質をコードする遺伝子を有する発現プラスミドにより宿主細胞を形質転換し、当該細胞内において上記遺伝子を発現させ、上記切断部位において上記プロテアーゼで切断されることにより融合タンパク質から目的ペプチドを得ることを特徴とする目的ペプチドの製造方法。

(16) 所望する切断部位において、0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体により切断されうる切断部位を介してC末端がアルギニン又はリジンである保護ペプチドと融合したN末端がアルギニン又はリジン以外である目的ペプチドからなる融合タンパク質をコードする遺伝子を有する発現プラスミドにより宿主細胞を形質転換し、当該細胞内において上記遺伝子を発現させ、上記切断部位

において上記プロテアーゼで切断されることにより融合タンパク質から目的ペプチドを得ることを特徴とする目的ペプチドの製造方法。

(17) 所望する切断部位を介してC末端がアルギニン又はリジンである保護ペプチドと融合したN末端がアルギニン又はリジン以外である目的ペプチドからなる融合タンパク質中の当該切断部位に係るP10位からP3位まで又はP3'位からP5'位までのアミノ酸配列中の任意の部位に1つの塩基性アミノ酸又は2つ若しくは3つの塩基性アミノ酸を連続して配し、上記切断部位が0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体により切断されうる切断部位である融合タンパク質をコードする遺伝子を有する発現プラスミドにより宿主細胞を形質転換し、当該細胞内において上記遺伝子を発現させ、上記切断部位において上記プロテアーゼで切断されることにより融合タンパク質から目的ペプチドを得ることを特徴とする目的ペプチドの製造方法。

(18) ポリペプチド中又は融合タンパク質中に0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体による切断を所望しない部位が存在する場合、当該部位に係るP3位に酸性アミノ酸を配することにより当該部位における切断を抑制することからなる上記(12)～(17)のいずれか1項に記載の方法。

(19) ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP10位～P3位の間に2又は3連続して塩基性アミノ酸を配することからなる上記(12)～(18)のいずれか1項に記載の方法。

(20) ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位

に係るP5位～P3位に3連続して塩基性アミノ酸を配することからなる上記(19)に記載の方法。

(21) 塩基性アミノ酸がアルギニン及び／又はリジンである上記(14)、(17)～(20)のいずれか1項に記載の方法。

(22) 塩基性アミノ酸がアルギニンである上記(21)に記載の方法。

(23) 0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いて、ポリペプチド中の所望する切断部位で切断することからなるポリペプチドの切断方法又は融合タンパク質中の所望する切断部位で切断することからなる目的ペプチドの製造方法であって、当該ポリペプチド中又は当該融合タンパク質中に0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体による切断を所望しない部位が存在する場合、当該部位に係るP3位に酸性アミノ酸を配することにより当該部位における切断を抑制することを特徴とする当該方法。

(24) 酸性アミノ酸がアスパラギン酸である上記(18)～(23)のいずれか1項に記載の方法。

(25) ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP5位からP1位までのアミノ酸配列がArg-Arg-Arg-Ala-Argである上記(12)～(24)のいずれか1項に記載の方法。

(26) ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP7位からP1位までのアミノ酸配列がAsp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Argである上記(12)～(24)のいずれか1項に記載の方法。

(27) 0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、ロイシン、メチオニン又はヒスチジンである上記(12)～(26)のいずれか1項に記載の方法。

(28) ポリペプチド又は融合タンパク質中の所望の切断部位に係るP1'位又は目的ペプチドのN末端がセリン又はアラニンであり、

97番目のアミノ酸がロイシンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いる上記(12)～(26)のいずれか1項に記載の方法。

(29) ポリペプチド又は融合タンパク質中の所望の切断部位に係るP1'位又は目的ペプチドのN末端がフェニルアラニン、アラニン、セリン、システイン又はチロシンであり、97番目のアミノ酸がメチオニンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いる上記(12)～(26)のいずれか1項に記載の方法。

(30) ポリペプチド又は融合タンパク質中の所望の切断部位に係るP1'位又は目的ペプチドのN末端がアラニン、バリン、イソロイシン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン又はアスパラギンであり、97番目のアミノ酸がヒスチジンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いる上記(12)～(26)のいずれか1項に記載の方法。

(31) 目的ペプチドが22残基から45残基のアミノ酸からなるペプチドである上記(2)～(11)、(15)～(30)のいずれか1項に記載の方法。

(32) 目的ペプチドが、副腎皮質刺激ホルモン(1-24)、モチリン又はカルシトニン前駆体である上記(31)に記載の方法。

(33) 宿主細胞が大腸菌である上記(2)～(11)、(15)～(32)のいずれか1項に記載の方法。

(34) 0mpTプロテアーゼ又は0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸がアラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体をコードする遺伝子を発現する菌体そのものを切断用プロテアーゼとして用いることからな上記(1)～(33)のいずれか1項に記載の方法。

(35) OmpTプロテアーゼ又はOmpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸がアラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンであるOmpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体をコードする遺伝子と当該プロテアーゼによる切断を所望するポリペプチド又は融合タンパク質をコードする遺伝子とを共発現することからなる上記(1)～(33)のいずれか1項に記載の方法。

図面の簡単な説明

図1は、融合タンパク質PRR及びPRXの構造を示す図である。融合タンパク質PRRのアミノ酸配列の上に各アミノ酸の位置を示し、下の数字はPRRのN末端からのアミノ酸配列番号を示す。 β -gal117S4Hは大腸菌の β -ガラクトシダーゼのN末端から117アミノ酸に由来する保護タンパク質、GLP-1(7-37)はヒトグルカゴン様ペプチド-1(7-37)、Linker peptideはアミノ酸配列番号128番目のグルタミンから153番目のアルギニンまでを示す。融合タンパク質PRRでのOmpTプロテアーゼ切断部位を(黒三角)で示す。融合タンパク質PRXはPRRの141番目アルギニンをその他の19種類のアミノ酸に置換した融合タンパク質である。

図2は、融合タンパク質PAnの構造を示す図である。融合タンパク質PAのアミノ酸配列の上に各アミノ酸の位置を示し、下の数字はPAのN末端からのアミノ酸配列番号を示す。 β -gal117S4Hは大腸菌の β -ガラクトシダーゼのN末端から117アミノ酸に由来する保護タンパク質、GLP-1(7-37)はヒトグルカゴン様ペプチド-1(7-37)、Linker peptideはアミノ酸配列番号128番目のグルタミンから153番目のアルギニンまでを示す。融合タンパク質PAでのOmpTプロテアーゼ

切断部位を（黒三角）で示す。融合タンパク質PAnにおいてアミノ酸置換導入後のアルギニンを斜体太字で示す。PAnの0mpTプロテアーゼ切断部位を↓で示す。図中右に融合タンパク質PAの切断率を100%とした場合の各融合タンパク質の切断率を示す。aはArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰での切断率も含む。bはArg¹⁴¹-Arg¹⁴²での切断率も含む。cはArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴での切断率も含む。

図3は、融合タンパク質PA1A3'、PA1' A3'、PA23'、PA323'及びPA2' 3'の構造を示す図である。融合タンパク質PA3'のアミノ酸配列の上に各アミノ酸の位置を示し、下の数字はPA3'のN末端からのアミノ酸配列番号を示す。β-gal117S4Hは大腸菌のβ-ガラクトシダーゼのN末端から117アミノ酸に由来する保護タンパク質、GLP-1(7-37)はヒトグルカゴン様ペプチド-1(7-37)、Linker peptideはアミノ酸配列番号128番目のグルタミンから153番目のアルギニンまでを示す。アルギニンは太字で示す。融合タンパク質PA3'での0mpTプロテアーゼ切断部位を▽（切断率 73%）、（黒三角）（切断率 220%）で示す。融合タンパク質PA1A3'、PA1' A3'、PA23'、PA323'及びPA2' 3'においてPA3'にアミノ酸置換導入後のアミノ酸を斜体で示し、0mpTプロテアーゼ切断部位を↓で示す。図中右に融合タンパク質PAの切断率を100%とした場合の各融合タンパク質のArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹（●）とArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴（○）での切断率を示す。NDは検出されなかったことを示す。aはArg¹⁴⁰-Ala¹⁴¹での切断率を示す。bはArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰の切断率も含む。cはArg¹⁴²-Arg¹⁴³での切断率も含む。

図4は、融合タンパク質PA3D23'、PA4D23'及びPA5D23'の構造を示す図である。融合タンパク質PA23'のアミノ酸配列の上に各アミノ酸の位置を示し、下の数字はPA23'のN末端からのアミノ酸配列番号を示す。β-gal117S4Hは大腸菌のβ-ガラクトシダーゼのN

末端から117アミノ酸に由来する保護タンパク質、GLP-1(7-37)はヒトグルカゴン様ペプチド-1(7-37)、Linker peptideはアミノ酸配列番号128番目のグルタミンから153番目のアルギニンまでを示す。アルギニンは太字で示す。融合タンパク質PA23'での主な0mpTプロテアーゼ切断部位を(黒三角)で示す。融合タンパク質PA3D23', PA4D23'及びPA5D23'においてPA23'にアミノ酸置換導入後のアミノ酸を斜体で示し、0mpTプロテアーゼ切断部位を↓で示す。図中右に融合タンパク質PAの切断率を100%とした場合の各融合タンパク質のArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ (●)とArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴ (○)での切断率を示す。NDは検出されなかったことを示す。

図5は、融合タンパク質PRMT及びPMTの構造を示す図である。両融合タンパク質のアミノ酸配列上の数字はN末端からのアミノ酸配列番号を示す。β-gal117S4Hは大腸菌のβ-ガラクトシダーゼのN末端から117アミノ酸に由来する保護タンパク質、Linker peptideはPRMTではアミノ酸配列番号128番目のグルタミンから140番目のアルギニンまでを、PMTではアミノ酸配列番号128番目のグルタミンから143番目のアルギニンまでを示す。融合タンパク質PRMTの140番目のアルギニンまでのアミノ酸配列は図1に示した構造を有する融合タンパク質PRR(特願2000-602803参照)のN末端から140番目のアルギニンまでのアミノ酸配列と一致する。また、融合タンパク質PMTの143番目のアルギニンまでのアミノ酸配列は融合タンパク質PA23'(図4)のN末端から143番目のアルギニンまでのアミノ酸配列と一致する。融合タンパク質PMTの0mpTプロテアーゼによる切断部位を●で示し、0mpTプロテアーゼ変異体D97Mによる切断部位を○で示した。RAR-motilinはPMTからArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹の切断により遊離するArg-Ala-Arg-motilinからなるポリペプチド、RRAR-motilinはPMTからArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰の切断により遊離するArg-Arg-Ala-Arg-motilin

からなるポリペプチドである。

図 6 は、融合タンパク質PRMT及びPMTと野生型OmpTプロテアーゼ及びOmpTプロテアーゼ変異体D97Mの反応（25℃、120分）をHPLCで解析した結果を示す。

図 7 は、W3110 M25 PMT及びW3110 M25 OmpT D97M発現菌の2 L高密度培養における培養液OD₆₆₀の経時変化を示す図である。○はW3110 M25 PMT、●はW3110 M25 OmpT D97Mである。両組換え大腸菌ともにグルコース濃度1.5%、32℃で培養を開始し、培養開始後約12時間でグルコースが枯渇した後に2%となるようにグリセロールを添加し、37℃に培養温度を変え、その後、グリセロールが枯渇するごとに同様に2%となるようにグリセロールを添加し（W3110 M25 PMT, ↑; W3110 M25 OmpT D97M, ↓）、W3110 M25 PMTは培養開始後24時間でW3110 M25 OmpT D97Mは20時間で培養を終了した。

図 8 は、融合タンパク質PMTからのOmpTプロテアーゼ変異体OmpT D97Mによるモチリン遊離の経時変化を示す。

図 9 において、Aは60分後の反応液をHPLCで、BはSDS-PAGEで分析した結果を示す。レーン 1, PMTのみ; 2, PMT+D97M; 3, モチリン標準品。反応液組成: 4 M 尿素, 50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0), 2 mM EDTA, PMT OD₆₆₀=50, OmpT D97M OD₆₆₀=16; 反応温度: 25℃; 120 min⁻¹で振とう

図10において、Aは実施例 1、3、5、7、9、16及び18で構築した融合タンパク質発現プラスミドの構造を示す。Bは実施例11で構築したOmpTプロテアーゼ又はOmpTプロテアーゼ変異体発現プラスミドの構造を示す。

図11は、融合タンパク質PAC及びPCTの構造を示す。各融合タンパク質のアミノ酸配列下の数字はN末端からのアミノ酸配列番号を示す。β-gal117S4Hは大腸菌のβ-ガラクトシダーゼのN末端から117

アミノ酸に由来する保護タンパク質、Linker peptideはアミノ酸配列番号128番目のグルタミンから143番目のアルギニンまでを示す。各融合タンパク質の143番目のアルギニンまでのアミノ酸配列は融合タンパク質PA23'（図4）のN末端から143番目のアルギニンまでのアミノ酸配列と一致する。

図12は、融合タンパク質と野生型OmpTプロテアーゼ及びOmpTプロテアーゼ変異体の反応をHPLCで解析した結果を示す。PACはD97Lと10分間、PCTはD97Hと2時間、25℃で反応させた。

図13は、実施例17で構築したOmpTプロテアーゼ変異体D97M発現プラスミドの構造を示す。MCS、マルチクローニングサイト。

図14は、実施例17で作製した融合タンパク質PMTとOmpTプロテアーゼ変異体D97Mを共発現するW3110 M25形質転換大腸菌から得られた封入体を用いた融合タンパク質PMTからのヒトモチリンの遊離を示すSDS-PAGEによる分析結果である。Mr, タンパク質分子量マーカー；レーン 1, 反応開始後20分；2, 40分；3, 60分；4, 120分；5, 180分；6, 240分；7, 300分；8, 360分；9, 1440分（24時間）；10, モチリン標準品。反応液組成：4 M 尿素, 50 mM リン酸ナトリウム（pH 7.0）, 2 mM EDTA, 封入体 OD₆₆₀=20；反応温度：25℃

図15は、融合タンパク質PMT、PMT6D及びPMT7Dの構造を示す図である。融合タンパク質のアミノ酸配列上の数字はN末端からのアミノ酸配列番号を示す。β-gal117S4Hは大腸菌のβ-ガラクトシダーゼのN末端から117アミノ酸に由来する保護タンパク質、Linker peptideはアミノ酸配列番号128番目のグルタミンから143番目のアルギニンまでを示す。これらの融合タンパク質の143番目のアルギニンまでのアミノ酸配列はそれぞれ融合タンパク質PA23'、PA3D23'及びPA4D23'（図4）のN末端から143番目のアルギニンまでのア

ミノ酸配列と一致する。それぞれの融合タンパク質のOmpTプロテアーゼ変異体D97Mによる切断部位を矢印で示した。AR-motilinはArg¹⁴¹-Ala¹⁴²の切断により遊離するAla-Arg-motilinからなるポリペプチド、RRAR-motilinはArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰の切断により遊離するArg-Arg-Ala-Arg-motilinからなるポリペプチドである。

図16は、融合タンパク質PMTとOmpTプロテアーゼ変異体D97Mの反応（25℃、120分）をHPLCで解析した結果を示す。括弧内の数字は融合タンパク質から生成したモチリン濃度を100とした場合の各副産物濃度を示した。

図17は、融合タンパク質PMT6DとOmpTプロテアーゼ変異体D97Mの反応（25℃、120分）をHPLCで解析した結果を示す。括弧内の数字は融合タンパク質から生成したモチリン濃度を100とした場合の各副産物濃度を示した。

図18は、融合タンパク質PMT7DとOmpTプロテアーゼ変異体D97Mの反応（25℃、120分）をHPLCで解析した結果を示す。括弧内の数字は融合タンパク質から生成したモチリン濃度を100とした場合の各副産物濃度を示した。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明を詳説する。

pG117S4HompPRRはグルカゴン様ペプチド-1（7-37）（GLP-1（7-37））を含む融合タンパク質（PRR）を発現する発現プラスミドである。

本融合タンパク質の保護タンパク質は大腸菌β-ガラクトシダーゼのN末端117アミノ酸を含むβ-gal117S4Hを保護タンパク質とし、アルギニン-アルギニン配列を配した26アミノ酸よりなるリンカー配列及びGLP-1(7-37)より構成されている。大腸菌OmpTプロテア

一ゼはPRRのリンカー配列においてアルギニン-アルギニン配列の中央のペプチド結合を切断し、GLP-1(7-37)を含む44アミノ酸の目的ポリペプチドを遊離させることを本発明者は既に見出している(Okuno, K. et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:127-134, 2002)。

次に本発明者は融合タンパク質 (PRR) を基にP1位とP1' 位がアルギニン、これらの部位以外のP10位からP5' 位のアミノ酸をすべてアラニンに置換した融合タンパク質であるPAを作製した。

更に、この融合タンパク質PAを出発として各部位のアラニンを1箇所ずつアルギニンに置換した融合タンパク質 (PAn) を作製して、OmpTプロテアーゼ切断部位周辺に塩基性アミノ酸であるアルギニンを配することによるOmpTプロテアーゼ切断への影響を検討した。

その結果、切断部位周辺アミノ酸配列のP10位からP3位あるいはP3' 位からP5' 位に塩基性アミノ酸 (例えば、アルギニン、リジン) が存在する場合 (但し、P6又はP4位の1箇所のみを塩基性アミノ酸で置換した場合を除く)、切断率が上昇することを新たに見出した。

一方、P2位又はP2' 位がアルギニンの場合は、切断部位として配しているP1位とP1' 位の2つのアルギニンに加えてアルギニンが3連続する配列となるが、この場合には逆に切断率が減少した。即ち、切断部位周辺にアルギニンを存在させることで切断率は上昇するが、アルギニンが3連続した場合には、切断率は減少するということであり、切断部位周辺アミノ酸配列をアルギニンに置換することにより切断率の制御が可能であることが判明した。

更に、P3' 位にアルギニンが存在する融合タンパク質PA3' (切断部位周辺アミノ酸配列が-Ala-Ala-Arg[P1]-Arg[P1'] -Ala-Arg[P3'] -Ala[P4'] -Ala-)において、P3' 位のアルギニンとP4' 位のア

ラニンの間での切断も生じていることが判明し、ここにアルギニン-アラニンの間を効率よく切断できる配列が見出された。塩基性アミノ酸が連続して並ぶ配列以外の配列で効率よく基質が切断されたことは、OmpTプロテアーゼをプロセッシング酵素として使用する場合に極めて重要であるため、本発明者らは、さらなる検討を実施した。

切断部位周辺にアルギニンを配することにより切断効率が上昇するという知見、更にはアルギニンが3連続する場合にはアルギニン-アルギニン間で切断されにくくなるという知見に基づき、種々のアミノ酸配列を検討したところ、アミノ酸配列-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala-において、主たる切断が-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg↓Ala-で生じることを見出した。即ち、3連続する塩基性アミノ酸を配することにより、それ以降に存在する塩基性アミノ酸部位での切断が促進されるという性質があることが明らかとなった。

しかし、上記アミノ酸配列(-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala-)では3連続するアルギニン配列中でもなお切断が生じた。これを減少させる目的でN末端側上流アミノ酸配列に酸性アミノ酸であるアスパラギン酸を配したアミノ酸配列-Asp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg↓Ala-を作製した。この配列を用いることにより、アルギニン-アラニンの間の切断率が半分に低下したが、3連続するアルギニン配列中の切断を抑えることに成功した。即ち、これらの配列-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg↓Ala-又は-Asp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg↓Ala-においては、OmpTプロテアーゼの切断がアルギニン-アラニン間で生じ易いように最適化されているものと考えられる。これらの配列(-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala-及びAsp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala-)、特に望ましくは、Asp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Ala-を用いることによりP1'位がアラニン以外のアミノ酸でも効率よく切断できる

ことが期待された。

以上の結果から、-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg↓Ala-の切断部位のC末端側アミノ酸配列に生理活性ペプチドを配することによりOmpTプロテアーゼで直接融合タンパク質からその生理活性ペプチドを切出すことが可能かどうかを、モチリン（N末端アミノ酸はフェニルアラニン）を目的ポリペプチドとして検討した。モチリンを目的ポリペプチドとする融合タンパク質PMTを作製し、OmpTプロテアーゼを作用させモチリンの切出しを試みた。

ところが、融合タンパク質PMTからモチリンを効率よく切出せないことが判明した。この結果より、OmpTプロテアーゼの基質特異性としてP1'位のアミノ酸に関して寛容ではあることは既知であるが、効率的な切断に利用するには本プロテアーゼ自体に変異を導入しP1'位のアミノ酸に対する特異性を高める必要があると考えられた。

すでにOmpTの結晶構造を解析した論文(Vandeputte-Rutten, L. et al. EMBO J. 20: 5033-5039, 2001)が発表されており、これに関連する論文(Kramer, RA. et al. FEBS lett. 505: 426-430, 2001)中で基質のP1'位のアミノ酸とOmpTプロテアーゼのAsp⁹⁷（N末端から97番目のアスパラギン酸）が相互作用しているのではないかと考察されている。この97番目のアミノ酸を置換した際に生ずる基質特異性の変化を調べるため、OmpTのAsp⁹⁷を20種類のアミノ酸（アスパラギン酸への同義置換を含む）に置換した変異体に対するプラスミドを作製し、これらをOmpT欠損大腸菌BL21株に導入してOmpTプロテアーゼ変異体OmpT D97X（Xは20種類のアミノ酸に対応）発現大腸菌20株を調製した。

これらをOmpTプロテアーゼのP1'位基質特異性を調べる目的で調製した図1に示した構造を持つ融合蛋白質PRX（Xは20種類のアミノ

酸に対応、特願2000-602803参照)を基質として作用させ、各々の融合蛋白質の切断を調べた。。その結果、0mpTプロテアーゼの97番目のアスパラギン酸をアラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、トレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジンに置換したものは、切断率に高低はあるものの、融合蛋白質PRXを切断する活性を有することが判明した。特に変異体0mpT D97Lはセリン、アラニンに、0mpT D97Mはフェニルアラニン、アラニン、セリン、システイン及びチロシンに、0mpT D97Hはアラニン、バリン、イソロイシン、メチオニン、スレオニン、システイン及びアスパラギンにそれぞれ高い特異性を示すことが明らかとなった。

これより得られた知見を用いてモチリンのN末端アミノ酸がフェニルアラニンであることを考慮し、P1'部位がフェニルアラニンの場合に切断が良好であった0mpT D97Mを前述の融合タンパク質PMTに対して作用させたところ、効率よくモチリンを切出すことが可能となった。即ち、本発明者らは0mpTプロテアーゼの切断部位周辺の配列を最適化し、更に、0mpTプロテアーゼ変異体を利用することにより、これまで所望の位置での切断が困難であった0mpTプロテアーゼによる切断を可能なものとすることに成功した。

更に、この手法が工業的に利用可能であることを検証するために融合タンパク質PMT発現大腸菌及び0mpT D97Mプロテアーゼ変異体発現大腸菌を高密度培養し、融合タンパク質PMT発現大腸菌から調製した封入体を含む反応液に0mpT D97Mプロテアーゼ変異体発現大腸菌そのものを直接添加して25℃、1時間作用させた。この反応液に20 mM 酢酸 (pH 4.0)を添加し、沈殿除去後、上澄液を陽イオン交換及び逆相クロマトグラフィーに供した。これら一連の操作により融合タンパク質PMT発現大腸菌培養液1 Lあたり純度99.0%以上のモ

チリンを回収率52%で160 mg生産することができ、十分に工業化可能な水準であることが示された。

更に、このポリペプチド生産系の汎用性を確かめるために目的ポリペプチドとしてヒト副腎皮質刺激ホルモン（1-24）（N末端アミノ酸がセリン）及びヒトカルシトニン前駆体（N末端アミノ酸がシステイン）を配した融合タンパク質を調製し、0mpTプロテアーゼ変異体で処理した。その結果いずれの場合においても所望する目的ポリペプチドを得ることができこの系の汎用性の広さを示すことに成功した。

また、融合タンパク質PMTと0mpT D97Mプロテアーゼ変異体を共発現する大腸菌を調製し、この大腸菌を培養して得られた封入体を尿素により溶解しただけで融合タンパク質PMTからヒトモチリンが遊離可能であることも確認した。

なお、後述の実施例において示されていない具体的な実験操作は特に記載のない限り以下の方法に従った。

（1）発現プラスミドの構築

発現プラスミドの構築は大腸菌JM109を用いて常法に従った。構築された発現プラスミドが目的のプラスミドであることを変異導入のために行なったPCRにより得られたDNA領域及び合成DNAによる置換で得られたDNA領域の塩基配列決定により確認した。なお、実施例1、3、5、7、9、16、18で作製したプラスミドの構造を図10Aに実施例11で作製したプラスミドの構造を図10Bに示した。実施例17で作製したプラスミドは図13に示した。

（2）0mpTプロテアーゼ酵素活性の測定

0mpTプロテアーゼ活性はダイノルフィンA（ペプチド研究所製）を基質として測定した。

0.1% Triton X-100を含む50 mMリン酸ナトリウム(pH 6.0) 40 μ

Lに1 mg/mLのダイノルフィンA 5 μ Lを加えて、これに0mpTプロテアーゼ活性測定サンプル5 μ Lを添加して反応を開始した。反応は25°Cで10分間行ない、1 N HCl 5 μ Lを加えて反応を停止した。反応液を10000 \times g、3分間遠心分離して上澄液を回収し、20 μ LをHPLCに供し、分析した。

HPLC分析はYMC PROTEIN RPカラムを用い、カラム温度40°C、流速1 mL/minで行った。3分間0.1% トリフルオロ酢酸を含む10% アセトニトリルで洗浄した後に、10分間0.1% トリフルオロ酢酸を含む10-15%アセトニトリルのリニアグラジエントにより溶出を行った。220 nmの吸収をモニターし、分解産物であるペプチドTyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Argを検出した。この反応条件下、25°C 1分間でダイノルフィンA 1 μ molを切断した時の0mpTプロテアーゼ活性を1 unitとした。

(3) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

融合タンパク質の切断を検討するために用いたSDS-ポリアクリルアミド電気泳動はゲルにテフコ社製の16% Peptide-PAGEmini、泳動バッファーにバイオラッド社製のTricine泳動バッファー、分子量マーカーにテフコ社又はバイオラッド社製のタンパク質分子量マーカーを用いて行った。サンプルに等量の4 M尿素を含む 2 \times SDS-PAGEサンプルバッファーを添加して100°C、5分間加熱した。10 μ Lを電気泳動に供し、テフコ社の指定する泳動条件で電気泳動を行った。泳動後、クマジーブリリアントブルーR-250を含む染色液で染色した。

(4) 封入体の調製

本実施例において、大腸菌で融合タンパク質は封入体として発現され、大腸菌が0mpTプロテアーゼを発現している場合には得られた封入体を尿素で溶解しただけで0mpTプロテアーゼによる切断を受け

る。そこで切断を避けるために融合タンパク質発現プラスミドで0mpTプロテアーゼ欠損大腸菌株であるW3110 M25を形質転換して、融合タンパク質を封入体として発現させた。各融合タンパク質を発現するW3110 M25組換え大腸菌を2 L三角フラスコ中でテトラサイクリン10 mg/Lを含むLB液体培地(0.5% (w/v) 酵母エキス、1% (w/v) トリプトン、0.5% 塩化ナトリウム)400 mLを用いて37℃、1晩、150 rpmで旋回培養した。

翌日、4℃、6000×g、10分間遠心分離により菌体を回収し、これを超音波処理して菌体破碎した。この菌体破碎液に脱イオン水を加えて30 mLとして、4℃、25000×g、15分間遠心分離し、上清を廃棄して沈殿画分(封入体)を回収した。更に、30 mLの50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 1% Triton X-100に懸濁して4℃、25000×g、15分間遠心分離により沈殿を得た。この沈殿を30 mLの脱イオン水で懸濁後、4℃、25000×g、15分間遠心分離して沈殿を回収した。これに脱イオン水を添加して1.5 mLとなるようにし、懸濁後4℃、10000×g、30分間遠心分離することにより沈殿を得て、再度同操作を繰り返して、OD₆₆₀=100となるように脱イオン水で沈殿を懸濁し、このようにして調製した封入体を0mpTプロテアーゼ反応の基質として使用した。

(5) 0mpTプロテアーゼ反応

融合タンパク質を基質として0mpTプロテアーゼ反応を次のように行った。10 M 尿素 20 μLに1 M リン酸ナトリウム (pH 7.0) 2.5 μL、及び50 mM EDTA 2 μLを加え、融合タンパク質封入体 (OD₆₆₀=100) 10 μLを添加して、封入体を溶解した。これに水を10.5 μL加え、1.4 units/mLの0mpTプロテアーゼ 5 μLを添加して反応液量50 μLで反応を開始した。反応温度は25℃で30分間行なった。

0mpTプロテアーゼと反応して得られたポリペプチドの定量は特に

断りのない限り以下の条件でHPLCにより行った。OmpTプロテアーゼ反応液に150 μ Lの6% 酢酸、2 M 尿素を添加して反応を停止し、10 000 \times g、3分間遠心分離して上澄液20 μ LをYMC PROTEIN RPカラムに供した。HPLCはカラム温度40 $^{\circ}$ C、流速1 mL/minで行った。20分間0.1% トリフルオロ酢酸を含む30-50% アセトニトリルのリニアグラジエントにより溶出を行ない、214 nmの吸収をモニターしてポリペプチドの定量を行った。

(6) ポリペプチドの質量解析

切断部位を推定するために、HPLCで単離したポリペプチドの質量分析をThermo Finnigan社製 SSQ710を用いて行った。

(7) 大腸菌外膜画分の調製

宿主をW3110 M25とするOmpTプロテアーゼ又はOmpTプロテアーゼ変異体を発現する大腸菌の外膜画分を以下のように調製して実施例10、14、16及び18でOmpTプロテアーゼ又はOmpTプロテアーゼ変異体として融合タンパク質の切断反応に用いた。培養方法は(4)と同様に行い、培養終了後、4 $^{\circ}$ C、6000 \times g、10分間遠心分離により菌体を得た。この菌体を10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、1 mM EDTA (TE)で懸濁、超音波処理により菌体破碎した。この菌体破碎液を4 $^{\circ}$ C、1000 \times g、10分間遠心分離して沈殿を廃棄して破碎液を回収した。更に、この破碎液を4 $^{\circ}$ C、36000 \times g、40分間遠心分離して沈殿を回収し、TEで懸濁、再度4 $^{\circ}$ C、36000 \times g、40分間遠心分離した。得られた沈殿をOD₆₆₀=10となるようにTEで懸濁した。使用するまで-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

実施例

以下に実施例を示し、本発明を詳細に説明する。

実施例1. 融合タンパク質PAnの調製

0mpTプロテアーゼは大腸菌外膜に存在するエンドプロテアーゼである。本酵素の切断において切断部位周辺のアミノ酸配列中の塩基性アミノ酸が非常に大きく影響すると考えられたため、本発明者は本酵素の既知の切断部位を利用し、以下に示す実験を行ない、塩基性アミノ酸の位置と切断率との関係を検討した。

0mpTプロテアーゼにより切断される構造を持つ図2に示した融合タンパク質PA（リンカーペプチドを介した大腸菌の β -ガラクトシダーゼのN末端117アミノ酸に由来する保護タンパク質(β -gal117S4H)とヒトグルカゴン様ペプチド-1(7-37)(GLP-1(7-37))の融合タンパク質の切断部位のP10位からP2位及びP2'位からP5'位のアラニンをアルギニンに置換することにより、リンカーペプチド内に存在する0mpTプロテアーゼ切断部位を変換した融合タンパク質PAn(図2:nは切断部位に対するアミノ酸の位置[Pn]に対応し、P10からP2及びP2'からP5'まで)を作製し、0mpTプロテアーゼによる切断について検討することにした。

大腸菌0mpTプロテアーゼの認識・切断部位としてアルギニン-アルギニン配列が融合タンパク質のリンカー部分に挿入された融合タンパク質PRR(図1)の発現プラスミドであり図10Aに示した構造を有するpG117S4HompPRR(特願2000-602803参照)をもとにPCRでの部位特異的変異導入及び合成DNAとの置換により融合タンパク質PAを発現するプラスミドであり図10Aに示した構造を有するpG117S4HompPAを構築した。更に、融合タンパク質PAnの発現プラスミドpG117S4HompPAnは図2に示す構造を有する融合タンパク質PAの発現プラスミドpG117S4HompPAにPCRを用いて塩基置換を導入して構築した。構築したプラスミドの構造を図10Aに示した。これらの融合タンパク質発現プラスミドで0mpTプロテアーゼ欠損大腸菌株であるW3110 M25を形質転換して、融合タンパク質を封入体として発現させた。

実施例 2. 0mpTプロテアーゼによる融合タンパク質PAnの切断

0mpTプロテアーゼにより切断される構造を持つ図2に示した融合タンパク質PAの0mpTプロテアーゼ切断部位周辺のアラニンをアルギニンに置換した融合タンパク質PAn(図2)を用いて、0mpTプロテアーゼによる切断率を検討した。PAnをpH 7.0で特願2000-602803に従ってベンザミジンセファロース6Bを用いて精製した0mpTプロテアーゼ標品と反応させた。酵素反応後、HPLCにより分析した結果から得られた切断率もあわせて図2に示す。また、質量分析の結果から得られた切断部位も図2に示す。

すべてのPAnはもとのPAと同じ部位で0mpTプロテアーゼによる切断を受け、PA2、PA2' 及びPA3' はその他の部位でも切断が起こることが示された(図2)。特に、PA3' はArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹及びArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴の2か所で切断され(切断率はそれぞれ220, 73%)、連続する塩基性アミノ酸以外の間(Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴)で切断されていることがわかった。

また、PA2とPA2' を除くすべてのPAnにおいて切断率の上昇が認められ、切断部位周辺アミノ酸配列中のP10からP3及びP3' からP5' にアルギニンを配することにより切断率を向上させることができると考えられる。それらのうちでもPA4が最も切断率が高くPAの約5倍を示し、P4位にアルギニンを配することが最も効果的であることがわかった。一方、PA2及びPA2' では切断率が約1/3にまで減少し、3連続するアルギニン配列になると切断率が低下することがわかった。

実施例 3. 融合タンパク質PA1A3'、PA1' A3' の調製

0mpTプロテアーゼは連続する塩基性アミノ酸の間を主に切断する酵素であることが知られている。ところが実施例2の結果から融合タンパク質PA3' が2か所Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹及びArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴で切断

されていることがわかり、しかもそのうちの1か所は-Arg↓Ala-の切断であることがわかった。その-Arg↓Ala-での切断率は連続する塩基性アミノ酸の間の切断率と比較すると低いが工業的に利用できる可能性のある切断率へ改善可能であると考えられた。

そこで融合タンパク質PA3'の2か所の切断部位Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹及びArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴のうちArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断をおさえるためにArg¹⁴⁰又はArg¹⁴¹をアラニンに置換したアミノ酸配列を有する融合タンパク質PA1A3'及びPA1'A3' (図3)の調製を行ない、それらのOmpTプロテアーゼによる切断を検討した。あわせて、これらの融合タンパク質を用いてArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴の切断にArg¹⁴⁰ (Arg¹⁴³、Ala¹⁴⁴をそれぞれP1位、P1'位とするとP4位)とArg¹⁴¹ (Arg¹⁴³、Ala¹⁴⁴をそれぞれP1位、P1'位とするとP3位)のいずれが必要であるかについても検討した。

融合タンパク質PA1A3'及びPA1'A3'の発現プラスミドpG117S4HompPA1A3'及びpG117S4HompPA1'A3'は図3に示す構造を有する融合タンパク質PA3'の発現プラスミドpG117S4HompPA3'にPCRを用いて塩基置換を導入して構築した。構築したプラスミドの構造を図10Aに示した。これらの融合タンパク質発現プラスミドでOmpTプロテアーゼ欠損大腸菌株であるW3110 M25を形質転換して、融合タンパク質を封入体として発現させた。

実施例4. 0mpTプロテアーゼによる融合タンパク質PA1A3'及びPA1'A3'の切断

図3に示した融合タンパク質PA1A3'及びPA1'A3'のOmpTプロテアーゼによる切断部位及び切断率を検討した。PA1A3'及びPA1'A3'をpH 7.0で特願2000-602803に従ってベンザミジンセファロース6Bを用いて精製したOmpTプロテアーゼ標品を用いて反応させた。酵素反応後、HPLCにより分析した結果から得られた切断率、質量

分析の結果から得られた切断部位も図3に示す。PA1A3' 及び PA1' A3' はともにArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴で切断されていることがわかった。

しかし、いずれの切断率もPAのArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断率に比べて低い値であった。またPA1' A3' ではArg¹⁴⁰-Ala¹⁴¹での切断も確認された。Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴を切断部位P1-P1' と考えた場合、Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴での切断はP3位のアルギニン (PA1A3' のArg¹⁴¹) 又はP4位のアルギニン (PA1' A3' のArg¹⁴⁰) のいずれかが存在すれば起こるが、P4位及びP3位の両方にアルギニンを配したPA3'の方がPA1A3' 及び PA1' A3' よりも切断率が高いことが示唆された。

実施例5. 融合タンパク質PA23'、PA323' 及びPA2' 3' の調製

実施例4の結果から融合タンパク質PA1A3' 及びPA1' A3' がArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴で切断されており、特にPA1A3' ではArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴のみで切断されたことがわかったが、その切断率は低いものであった。そこで融合タンパク質PA3' にアミノ酸置換を導入して、-Arg↓Ala- (Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴)の切断率を更に上げるようなアミノ酸配列の設計を試みた。実施例2の結果に基づき、-Arg↓Ala- (Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴)の切断率を上げ、連続する塩基性アミノ酸の間 (Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹)の切断率を下げると予想されるアミノ酸配列 (2連続するアルギニンを3連続又は4連続するアルギニンにした) を有する融合タンパク質PA23'、PA323' 及び PA2' 3' (図3) の調製を以下のように行ない、それらの0mpTプロテアーゼによる切断を検討した。

融合タンパク質PA23' 及び PA2' 3' の発現プラスミドpG117S4HompPA23' 及びpG117S4Homp PA2' 3' は図3に示す構造を有する融合タンパク質PA3' の発現プラスミドpG117S4HompPA3' にPCRを用いて塩基置換を導入して構築した。更に、融合タンパク質PA323' の発現プラスミドpG117S4HompPA323' は図3に示す構造を有する融合タンパク質PA23' の発現プラスミドpG117S4HompPA23' にPCRを用いて

塩基置換を導入して構築した。構築したプラスミドの構造を図10Aに示した。これらの融合タンパク質発現プラスミドで0mpTプロテアーゼ欠損大腸菌株であるW3110 M25を形質転換して、融合タンパク質を封入体として発現させた。

実施例 6. 0mpTプロテアーゼによる融合タンパク質PA23'、PA323' 及びPA2' 3' の切断

図3に示した融合タンパク質PA23'、PA323' 及びPA2' 3' の0mpTプロテアーゼによる切断部位及び切断率を検討した。PA23'、PA323' 及びPA2' 3' をpH 7.0で特願2000-602803に従ってベンザミジンセファロース6Bを用いて精製した0mpTプロテアーゼ標品を用いて25℃、30分間反応させた。酵素反応後、HPLCにより分析した結果から得られた切断率、質量分析の結果から得られた切断部位も図3に示す。PA23'、PA323' 及びPA2' 3' はArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴で切断されていることが確認された。PA23' のArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴での切断率はPAのArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断率の2.9倍の切断率を示した。

Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰ 及びArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断も見られたがArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴での切断の13%であった。PA323' のArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴での切断率もPAのArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断率の2.9倍の切断率を示したがArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断も見られ、Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴での切断率の59%であった。PA2' 3' に関して、Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴での切断率はPAのArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断率の63%と低く、Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹ 及びArg¹⁴²-Arg¹⁴³での切断も確認された。以上のことから、これら3種の融合タンパク質のうちPA23' が-Arg↓Ala- (Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴)の切断率を上げて連続する塩基性アミノ酸の間の切断率を下げるための最適な配列を有することが示された。

実施例 7. 融合タンパク質PA5D23'、PA4D23' 及びPA3D23' の調製

融合タンパク質PA23' においてArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴の切断率が非常に高いことが実施例6の結果で示された。しかしながらArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰あるいはArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断も確認された。そこで、切断部位近傍に酸性アミノ酸がある場合にその切断がおさえられると考えられることから、Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰あるいはArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断をおさえるためにAla¹³⁶、Ala¹³⁷又はAla¹³⁸をアスパラギン酸に置換した融合タンパク質PA5D23'、PA4D23' 及びPA3D23' (図4)の調製を以下のように行ない、それらのOmpTプロテアーゼによる切断を検討した。

融合タンパク質PA5D23'、PA4D23' 及びPA3D23' の発現プラスミドpG117S4HompPA5D23'、pG117S4HompPA4D23' 及びpG117S4HompPA3D23' は図4に示す構造を有する融合タンパク質PA23' の発現プラスミドpG117S4HompPA23' にPCRを用いて塩基置換を導入して構築した。構築したプラスミドの構造を図10Aに示した。これらの融合タンパク質発現プラスミドでOmpTプロテアーゼ欠損大腸菌株であるW3110 M25を形質転換して、融合タンパク質を封入体として発現させた。

実施例8. OmpTプロテアーゼによる融合タンパク質PA5D23'、PA4D23' 及びPA3D23' の切断

図4に示した融合タンパク質PA5D23'、PA4D23' 及びPA3D23' のOmpTプロテアーゼによる切断部位及び切断率を検討した。PA5D23'、PA4D23' 及びPA3D23' をpH 7.0で特願2000-602803に従ってベンザミジンセファロース6Bを用いて精製したOmpTプロテアーゼ標品を用いて25℃、30分間反応させた。酵素反応後、HPLCにより分析した結果から得られた切断率、質量分析の結果から得られた切断部位も図4に示す。PA5D23'、PA4D23' 及びPA3D23' の主な切断部位はArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴であることが確認された。

特にPA4D23' のArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴での切断率はPA23' に比べると低下したがPAのArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断率の2倍の切断率を示した。一方PA23' で検出されたArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰及びArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断は検出されなかった。即ちArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹をP1-P1' と考えた場合にP3位にアスパラギン酸を配することによりその切断が抑えられたと考えられる。同様にArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰をP1-P1' と考えた場合にP2位にアスパラギン酸を配することによりその切断が抑えられたと考えられる。PA5D23' のArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴での切断率もPAのArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断率の1.9倍の切断率を示したがArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断も見られた。

PA3D23' に関して、PA4D23' と同様にArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰及びArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断は検出されなかった。即ちArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹をP1-P1' と考えた場合にP4位にアスパラギン酸を配することによりその切断が抑えられたと考えられる。同様にArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰をP1-P1' と考えた場合にP3位にアスパラギン酸を配することによりその切断が抑えられたと考えられる。しかしながらArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴での切断率はPAのArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断率と同程度でPA4D23' よりも低くかった。以上のことから、これら3種の融合タンパク質のうちPA4D23' が-Arg↓Ala- (Arg¹⁴³-Ala¹⁴⁴)での切断率をより高くして連続する塩基性アミノ酸の間の切断を抑えるための最適な配列を有することが示された。

従って、0mpTプロテアーゼを用いて保護タンパク質-リンカーペプチド-目的ポリペプチドからなる融合タンパク質よりN末端アミノ酸がアスパラギン酸、グルタミン酸及びプロリン以外の17種類のアミノ酸のいずれかである目的ポリペプチドを切出したい場合、-Asp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-のアミノ酸配列のC末端に続けてその目的ポリペプチドを配することにより特異的に切出しできる可能

性があると考えられる。

実施例 9. 融合タンパク質PRMT及びPMTの調製

実施例 6 の結果からOmpTプロテアーゼは図 3 で示した融合タンパク質PA23' における本酵素の切断部位周辺のアミノ酸配列において-Arg↓Ala-を効率よく切断できることが示された。このことから切断部位が-ArgXaa- (Xaaは酸性アミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン酸及びプロリン以外の17アミノ酸)であっても効率よく切断できることが予想された。そこで本発明者は実施例 6 に用いた融合タンパク質PA23' の143番目のアルギニンに続けてN末端が酸性アミノ酸、プロリン以外のアミノ酸であり、更に、塩基性アミノ酸以外のアミノ酸に置換した場合に本酵素による切断はどうなるのかについて検討した。

まずOmpTプロテアーゼによりArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹が切断される図 1 に示した構造を有する融合タンパク質PRR (特願2000-602803参照)のN末端から140番目のアルギニンに続けてヒトモチリンを配した融合タンパク質PRMT (図 5)を対照として作製した。次に、融合タンパク質PA23' (図 3 及び図 4)のN末端から143番目のアルギニンに続けてヒトモチリンを配した融合タンパク質PMT(図 5)を作製した。

融合タンパク質PRMTの発現プラスミドpG117S4HompPRMTとPMTの発現プラスミドpG117S4HompPMTの構造を図10Aに示した。これら2種類の融合タンパク質発現プラスミドでOmpTプロテアーゼ欠損大腸菌株であるW3110 M25をそれぞれ形質転換し、融合タンパク質生産菌を作製した。得られた菌株を培養後、融合タンパク質PRMT及びPMTを封入体として調製した。

実施例10. OmpTプロテアーゼによる融合タンパク質PRMT及びPMTの切断

図5に示した融合タンパク質PRMT及びPMTのOmpTプロテアーゼによる切断をW3110 M25を宿主としたOmpTプロテアーゼを発現する大腸菌の膜画分を用いてSDS-PAGEあるいはHPLCにより検討した。SDS-PAGEにおいてOmpTプロテアーゼによる融合タンパク質PMTの切断を確認できたが、PRMTの切断は検出できなかった。HPLCによっても融合タンパク質PMTの切断を確認できたが主にArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰あるいはArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹の塩基性アミノ酸対の間での切断であり、Arg¹⁴³-Phe¹⁴⁴でのペプチド切断断片即ちヒトモチリンは質量分析によりごくわずかに検出できたのみである。

このことから切断部位周辺のアミノ酸配列を-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-motilinとしただけではOmpTプロテアーゼにより主なペプチド切断断片としてヒトモチリンを切出すことができないとわかった。このことから本プロテアーゼの基質特異性としてP1'位のアミノ酸に関して寛容ではあるものの効率的な切断に利用するには本プロテアーゼ自体に変異を導入することにより更に、P1'位のアミノ酸に対する特異性を高める必要があると考えられた。そこでOmpTプロテアーゼ変異体を作製し、それを用いて融合タンパク質からヒトモチリンを主に切出すことができるかどうかを検討した。

実施例11. OmpTプロテアーゼ変異体発現大腸菌の調製

OmpTプロテアーゼの結晶構造を解析した論文(Vandeputte-Rutten, L. et al. EMBO J. 20: 5033-5039, 2001)及びこれに関連する論文(Kramer, RA. et al. FEBS Lett. 505: 426-430, 2001)中で基質のP1'位のアミノ酸とOmpTプロテアーゼのAsp⁹⁷が相互作用しているのではないかと考察されていたため、OmpTプロテアーゼのAsp⁹⁷に以下のようにPCRを用いて20種類のアミノ酸(アスパラギン酸への同義置換を含む)に置換したプラスミドを作製し、これらをOmpTプロテアーゼ欠損大腸菌BL21株に導入してOmpTプロテアーゼ変異体

発現大腸菌20株を調製した。

0mpTプロテアーゼのAsp⁹⁷に変異を導入しやすくし、できるだけPCRで増幅したDNA領域を少なくするために、図10Bに示した構造を持つ0mpTプロテアーゼ発現プラスミドp0mpTTcE（特願2000-602803参照）の0mpTプロテアーゼSer⁹⁹をコードするAGTをTCTに換えることにより制限酵素部位XbaIをPCRを用いて導入した0mpTプロテアーゼ発現プラスミドp0mpTXbaIの構築をまず行なった。次に0mpTプロテアーゼのAsp⁹⁷を20種類のアミノ酸（アスパラギン酸への同義置換を含む）に置換した変異体0mpT D97X(Xは置換後の20種類のアミノ酸を示す)を発現するプラスミドp0mpTD97Xは0mpTプロテアーゼ発現プラスミドp0mpTXbaI からPCRを用いた変異導入により構築した。発現プラスミドp0mpTXbaI及びp0mpTD97Xの構造を図10Bに示した。

得られた20種類の発現プラスミドp0mpTD97Xをそれぞれ0mpTプロテアーゼ欠損大腸菌BL21株に導入して0mpTプロテアーゼ変異体0mpT D97X発現大腸菌20株を調製した。これらの大腸菌を試験管によりテトラサイクリン10 μ g/mLを含むLB液体培地2 mLを用いて37℃でOD₆₆₀=1程度まで振とう培養後、菌体を遠心分離により回収した。これらに1 mLのTE（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0）を加えて懸濁後、遠心分離により菌体を回収した。更に、同操作を繰り返して得られた菌体にOD₆₆₀=2となるようにTEを添加して懸濁したものを0mpTプロテアーゼ変異体0mpT D97X反応用の菌体懸濁液とした。これらの菌体懸濁液は使用まで-20℃で凍結保存した。

実施例12. 0mpTプロテアーゼ変異体発現大腸菌菌体懸濁液中に含まれる0mpTプロテアーゼ変異体量の確認

0mpTプロテアーゼ変異体発現大腸菌菌体懸濁液中に含まれる0mpTプロテアーゼ変異体量がすべての菌体懸濁液において同量であることを確認するために抗0mpTプロテアーゼ抗体を用いてウェスタンブ

ロツティング及び免疫染色を行なった。抗0mpTプロテアーゼ抗体は精製0mpTプロテアーゼをウサギに免疫感作し、得られた抗血清からIgG画分を精製し、更に、ここから精製0mpTプロテアーゼにアフィニティーのある画分を回収することにより調製した。

1レーンあたりOD₆₆₀ = 0.01に相当する菌体懸濁液を12% SDS-PAGEに供し、電気泳動終了後、PVDF膜を用いてウェスタンブロッティングを行った。調製した転写膜をブロッキング液(5% (w/v) skim milk / 1x TBST*)に浸漬し、室温で30分間振とうした。次に抗0mpTプロテアーゼ抗体をブロッキング液で1000倍希釈したものに膜を浸漬し、室温で100分間振とうした。その後、液を捨て、1x TBST*で5分間、3回洗浄した。更に、ブロッキング液で1000倍希釈したパーオキシダーゼ結合抗ウサギIgG抗体液に膜を浸漬し、室温で45分間振とうした。

1x TBST*で10分間、4回洗浄後、ECLキット（アマシャムファルマシア社製）で検出した。宿主である0mpTプロテアーゼ欠損大腸菌BL 21株からはバンドは検出されず、その他の菌体懸濁液からはほぼ同等の強度でバンドが検出されたことから0mpTプロテアーゼ変異体発現大腸菌菌体懸濁液中に含まれる0mpTプロテアーゼ変異体量はすべての菌体懸濁液においてほぼ同量であろうと考えられた。（*1x TBS T=10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20）

実施例13. 0mpTプロテアーゼ変異体0mpT D97XのP1' 位基質特異性の検討

0mpTプロテアーゼは大腸菌外膜に存在するため反応液中に菌体のまま加えることにより基質と作用させることができる。そのため、0mpTプロテアーゼ変異体0mpT D97XのP1' 位基質特異性を調べる目的で図1に示した構造を有する融合蛋白質PRX（特願2000-602803参照）を基質として0mpTプロテアーゼ変異体0mpT D97Xとの反応性を

次のようにして検討した。10 M尿素20 μ Lに1 Mリン酸ナトリウム (pH 7.0) 2.5 μ L、及び50 mM EDTA 2 μ Lを加え、融合タンパク質封入体 ($OD_{660}=100$) 5 μ Lを添加して、封入体を溶解した。

これに水を10.5 μ L加え、実施例11で調製した0mpTプロテアーゼ変異体発現大腸菌菌体懸濁液 10 μ Lを添加して反応液量50 μ Lで反応を開始した。反応は25°Cで60分間行なった。反応して得られたペプチド断片の定量は0mpTプロテアーゼ反応時と同じ条件でHPLCにより行なった。結果を表1に示す。

表 1. 0mpTプロテアーゼ変異体0mpT D97Xによる融合タンパク質PRXの切断

融合タンパク質 PRX	0mpTプロテアーゼ変異体0mpT D97X													
	D97D	D97A	D97L	D97F	D97M	D97S	D97T	D97C	D97N	D97Q	D97E	D97H		
PRA	5.4	3.8	7.1	3.1	6.0	4.0	6.8	6.2	3.8	4.0	6.5	8.4		
PRV	3.5	-	-	-	3.0	-	-	3.2	-	-	5.0	7.8		
PRI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.1		
PRF	-	-	4.7	-	7.7	-	3.7	4.6	-	-	3.4	4.1		
PRM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.6		
PRS	3.9	-	9.1	-	7.1	-	7.4	5.6	4.1	4.4	7.2	8.7		
PRT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.0		
PRC	3.1	-	3.9	-	6.5	3.1	4.6	4.8	-	4.1	6.9	11		
PRY	-	-	3.2	-	6.2	-	-	-	-	-	-	-		
PRN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.5		
PRK	88	-	-	-	-	-	-	3.9	-	-	39	4.5		
PRR	100	-	-	-	-	-	-	4.0	-	-	49	4.6		

野生型OmpTプロテアーゼ(D97D)と融合タンパク質PRRの反応における切断率を100%として相対切断率を示した。-は相対切断率が3.0%未満であったことを示す。OmpTプロテアーゼ変異体D97V, D97I, D97P, D97W, D97G, D97Y, D97K及びD97Rは20種類いずれの融合タンパク質PRXとも相対切断率が3.0%未満であった。融合タンパク質PRL, PRP, PRW, PRG, PRQ, PRD, PRE及びPRHはいずれのOmpTプロテアーゼ変異体OmpT D97Xとも相対切断率が3%未満であった。

この結果、比較的切断率が高く、野生型OmpTプロテアーゼとは基質特異性の異なる変異体をいくつか得ることができた。融合タンパク質PRR及びPRKに対してはD97D (野生型) が、PRSにはD97Lが、PRFとPRYにはD97Mが、PRA、PRV、PRI、PRM、PRT、PRC及びPRNにはD97Hがそれぞれ最も高い特異性を示すことがわかった。これらのうちでPRFに特異性が高いD97M変異体を用いて実施例9で調製した融合タンパク質PRMT及びPMTとの反応を行ない、ヒトモチリンを切出せるかどうか検討した。

実施例14. OmpTプロテアーゼD97M変異体による融合タンパク質PMTからのヒトモチリンの切出し

OmpTプロテアーゼD97M変異体によるヒトモチリン融合タンパク質PRMT及びPMT (図5) からのヒトモチリンの切出し検討は宿主をW3110 M25とする野生型OmpTプロテアーゼ (D97D) 及びOmpTプロテアーゼ変異体D97Mを発現する大腸菌の外膜画分を用いて行なった。10 M尿素20 μ Lに1 Mリン酸ナトリウム (pH 7.0) 2.5 μ L、及び50 mM EDTA 2 μ Lを加え、融合タンパク質封入体 ($OD_{660}=100$) 10 μ Lを添加して、封入体を溶解した。これに水を10.5 μ L加え、組換え大腸菌の外膜画分5 μ Lを添加して反応液量50 μ Lで反応を開始した。反応は25°Cで120分間行なった。

反応液に150 μ Lの6% 酢酸、2 M 尿素を添加して反応を停止し、

10000×g、3分間遠心分離して上澄液50 μLをYMC PROTEIN RPカラムに供した。HPLCはカラム温度40℃、流速1 mL/minで行った。15分間0.1% トリフルオロ酢酸を含む20-27.5% アセトニトリルのリニアグラジエントにより溶出を行ない、214 nmの吸収をモニターした。切断部位はポリペプチド断片を単離して質量分析することにより同定した。図6に対照であるOmpTプロテアーゼD97D野生型及びD97M変異体によるヒトモチリン融合タンパク質PRMT及びPMTの切断をHPLCにより分析した結果を示した。また、表2にそれらの切断部位と切断率を示した。

表 2 0mpTプロテアーゼ変異体0mpT D97Mによる融合タンパク質PMTからのモチリン切出し

融合タンパク質	D97M			D97D (野生型)		
	Motilin*	RAR-motilin†	RRAR-motilin‡	Motilin*	RAR-motilin†	RRAR-motilin‡
PRMT	22	-	-	ND	-	-
PMT	78	ND	24	ND	23	100

NDは検出不能であることを示す。-は融合タンパク質の構造上検出しえないことを示す。
*PRMTからはArg¹⁴⁰-Phe¹⁴¹、PMTからはArg¹⁴³-Phe¹⁴⁴の切断により遊離
†PMTからはArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹の切断により遊離するArg-Ala-Arg-motilinからなるポリペプチド
‡PMTからArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰の切断により遊離するArg-Arg-Ala-Arg-motilinからなるポリペプチド

切断率はD97D野生型でPMTを切断した時のArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰での切断率を100として全て相対切断率で表示した。D97D野生型でPRMTは切断されず、PMTを切断した場合にはArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰及びArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹での切断が主であった。ところがD97M変異体を用いたところPRMTは切断されてモチリンが切り出された。PMTも切断されてモチリンが遊離されることがわかったが、Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰での切断も確認された。しかし、PMTから遊離されるモチリンの量はPRMTよりも3.5倍高かった。この結果はモチリンの切り出しにはD97M変異体が必要であり、切断部位周辺の配列によりモチリンの切断効率が変わることを示している。

実施例15. モチリンをモデルペプチドとした0mpTプロテアーゼ変異体を用いたポリペプチド生産例

0mpTプロテアーゼ変異体を用いたポリペプチド生産例としてW3110 M25モチリン融合タンパク質PMT生産菌（実施例9参照）及び0mpTプロテアーゼ変異体0mpT D97M発現菌（W3110 M25をp0mpTD97Mで形質転換して作製）をそれぞれ2 Lスケールで高密度培養を行ない、W3110 M25 0mpT D97M発現菌菌体を使用してPMTからモチリンを切出し、更に、精製を行なうことによりモチリンを生産した。それらは以下の3ステップからなる。

なお、モチリンの定量は反応液を6% 酢酸、2 M 尿素により希釈したものを実施例14に記載したHPLC分析法と同じ条件で分析し、ペプチド研究所より購入したヒトモチリンを標準品として用いることにより行なった。また、モチリンの純度は50分間0.1% トリフルオロ酢酸を含む0-50% アセトニトリルのリニアグラジエントによる溶出を行なった以外は定量時と同じ条件のHPLCにより分析した。

(1) W3110 M25モチリン融合タンパク質PMT生産菌及び0mpTプロテアーゼ変異体0mpT D97M発現菌の2 Lスケール高密度培養

W3110 M25モチリン融合タンパク質PMT生産菌及び0mpTプロテアーゼ変異体0mpT D97M発現菌の2 Lスケール高密度培養を以下のように行ない、それぞれから封入体及び発現菌体を調製した。PMT生産菌及び0mpT D97M発現菌を500 mL三角フラスコ中でテトラサイクリン10 mg/Lを含むLB液体培地100 mLを用いて37℃、1晩旋回培養した。翌日、これを4 g/L K_2HPO_4 , 4 g/L KH_2PO_4 , 2.7 g/L Na_2HPO_4 , 0.2 g/L NH_4Cl , 1.2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 4 g/L 酵母エキス, 2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 40 mg/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 40 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg/L $MnSO_4 \cdot nH_2O$, 10 mg/L $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 4 mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 mg/L $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 1 mg/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.5 mg/L H_3BO_4 , 15 g/L グルコース, 10 mg/Lテトラサイクリンを含む培地2 Lの入った攪拌培養器に移して32℃で培養を開始した。

グルコース枯渇後、2%となるようにグリセロールを添加し、培養温度を37℃に上げた。その後グリセロールが枯渇するごとに逐次2%となるようにグリセロールを添加し培養を継続した。培養経過は図7に示した。PMT生産菌は培養開始後24時間で終了し、培養液容量は1700 mLであった。マントンゴーリンにより菌体を破碎した後、4℃、6000×g、10分間遠心分離により沈殿を得た。この沈殿を2000 mLの脱イオン水で懸濁し、4℃、6000×g、10分間遠心分離により沈殿を回収した。更に、得られた沈殿を2000 mLの50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5 mM EDTA, 1% Triton-X 100に懸濁し、4℃、6000×g、10分間遠心分離により沈殿を回収した。

この沈殿を2000 mLの脱イオン水に懸濁して4℃、6000×g、10分間遠心分離して沈殿を回収した。再度同操作を繰り返して26 gの沈殿を得た。これを26 mLの脱イオン水に懸濁して封入体懸濁液 ($OD_{600} = 250$, 45 mL)とし使用するまで-20℃で凍結保存した。0mpTプロテアーゼ変異体W3110 M25 0mpT D97M発現菌は培養開始後20時間で

培養を終了し、培養液容量は2100 mLであった。培養液を4℃、6000×g、10分間遠心分離することにより沈殿を得た。この沈殿を2000 mLのTE (10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA)で懸濁し、4℃、6000×g、10分間遠心分離により沈殿を回収した。再度同操作を繰り返して311 gの沈殿を回収した。この沈殿を脱イオン水に懸濁して菌体懸濁液 ($OD_{660}=320$, 390 mL)とし使用するまで-20℃で凍結保存した。

(2) 0mpTプロテアーゼ変異体W3110 M25 0mpT D97M発現菌による封入体融合タンパク質PMTの切断

10 M尿素 8 mLに1 Mリン酸ナトリウム (pH 7.0) 1 mL、及び50 mM EDTA 0.8 mLを加え、融合タンパク質封入体 PMT ($OD_{660}=250$) 4 mLを添加して、封入体を溶解した。これに水を5.2 mLを加え、(1) で調製した0mpTプロテアーゼ変異体W3110 M25 0mpT D97M発現菌懸濁液($OD_{660}=320$) 1 mLを添加して反応液量20 mLで反応を開始した。反応は25℃で120 min⁻¹で振とうして60分間行なった。60分後、反応液13.5 mL (W3110 M25モチリン融合タンパク質PMT生産菌培養液100 mL分の封入体に相当) に40.5 mLの20 mM 酢酸 (pH 4.0)を添加して4℃、25000×g、10分間遠心分離により上澄液を得た。これによりほとんどの未反応融合タンパク質、保護ペプチド及び大腸菌由来タンパク質の除去ができた。

この上澄液に20 mM 酢酸 (pH 4.0)を加えることにより容量を200 mLとし、これを以下の精製に供した。この上澄液への20 mM 酢酸 (pH 4.0)添加によりpHを低下させて以下の陽イオン交換クロマトグラフィーに吸着させることができる。なお、図8にモチリン切出しの反応時間を決めるために同条件で120分までモチリン遊離の経時変化を観察した結果を示す。また、反応開始後、60分での融合タンパク質の切断をHPLC及びSDS-PAGEで分析した結果も合わせて図9

のA及びBに示す。SDS-PAGEで示すように、反応開始60分で融合タンパク質PMTがほぼ完全に切断されるために遊離するモチリンの増加がほぼ止まった。そのため反応時間を60分とした。

また、Arg¹⁴³-Phe¹⁴⁴で切断されて生じるヒトモチリンだけでなく、Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰で切断されて生じるポリペプチド(RRAR-motilin)も検出された。SDS-PAGE上ではヒトモチリンよりもRRAR-motilinの方がバンドが濃く量的に多く見える(図9のB)が、HPLCによる分析結果からはヒトモチリンのピークの方がRRAR-motilinよりもエリアが大きく量的に多い結果(図9のA)となり矛盾が生じた。これはSDS-PAGEにおいてRRAR-motilinの方がヒトモチリンよりも染色されやすいことが原因であると考えられる。従って、SDS-PAGEの結果ではバンドの濃さが正しく両者の量比を反映していないものと思われる。

(3) モチリンの精製

20 mM 酢酸 (pH 4.0)であらかじめ平衡化したアマシャム・ファルマシア社製SP-sepharose Fast Flow (27 mL, Φ26 mm X 50 mm)に上述の上澄液200 mLをアプライした。次に20 mM 酢酸 (pH 4.0)及び20 mM 酢酸 (pH 4.0), 0.1 M NaClをそれぞれ100 mLずつ通液して洗浄を行なった。溶出は20 mM 酢酸 (pH 4.0), 0.1-0.5 M NaClのリニアグラジエントで200 mL通液することにより行なった。この陽イオン交換クロマトグラフィーの流速は全て5 mL/minで操作した。溶出画分を5 mLずつ分取し、それらのHPLC分析結果からフラクションを選択しプールした。これにより融合タンパク質PMTがArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰で切断されて生じるポリペプチドの除去ができた。

このプールを0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA)であらかじめ平衡化済みのVydac 214TPB1520 (24 mL, Φ10 mm X 300 mm)に供した。0.1% TFA 100 mLを通液することにより洗浄し、溶出は0.1% TFA, 0-3

0% アセトニトリルリニアグラジエントで200 mL通液して行なった。この逆相クロマトグラフィーの流速は全て1.6 mL/minで操作した。溶出面分を4 mLずつ分取し、それらのHPLC分析結果からフラクションを選択しプールした。本精製の結果を表3に示す。

表3 ヒトモチリンの精製結果

精製段階	容量 (mL)	ヒトモチリン 濃度(mg/mL)	ヒトモチリン (mg)	回収率 (%)	純度 (%)
反応	13.5	2.32	31	100	5.87
酸性沈殿	200	0.159	32	100	48.8
陽イオン交換	40.0	0.591	24	77	94.2
逆相	22.5	0.696	16	52	> 99.0

W3110 M25 PMT培養液0.1 L相当の封入体を用いて精製

本精製で得られた標品のHPLC分析、質量分析及びN末端アミノ酸分析の結果はヒトモチリンの示すものと一致した。本精製によりW3110 M25モチリン融合タンパク質PMT生産菌培養液1 Lあたり純度99.0%以上のヒトモチリンを回収率52%で160 mg得ることが可能であることが示された。

実施例16. 0mpTプロテアーゼ変異体を用いた融合タンパク質からの生理活性ポリペプチド遊離例

ヒトモチリン以外に0mpTプロテアーゼ変異体を用いて生理活性ポリペプチドを融合タンパク質から遊離できるかどうかを調べるために図11に示したヒト副腎皮質刺激ホルモン(1-24)融合タンパク質PAC及びヒトカルシトニン前駆体融合タンパク質PCTを発現する図10のAに示した構造を持つプラスミドを構築し、それらをW3110 M25へ導入した形質転換体から各融合タンパク質を封入体として調製した。それぞれ0mpTプロテアーゼ変異体D97LあるいはD97H発現大腸菌

W3110 M25の外膜画分と10分間あるいは2時間、25℃で反応させた。コントロールとして両融合タンパク質共に野生型OmpTプロテアーゼを用いた反応も行った。HPLCによる解析結果を図12に示す。

また、HPLCにより各融合タンパク質の切断断片を単離して質量分析も行った。HPLCはYMC PROTEIN RPカラムを用いてカラム温度40℃、流速1 mL/minで行った。50分間0.1% トリフルオロ酢酸を含む10-50% アセトニトリルのリニアグラジエントにより溶出を行ない、214 nmの吸収をモニターした。融合タンパク質PACは野生型OmpTプロテアーゼによりArg¹⁴³-Ser¹⁴⁴で切断されてヒト副腎皮質刺激ホルモン (1-24)を遊離した。また、Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹でも切断され、RAR-ACTHを遊離した。図12には示されていないがArg¹⁴³-Ser¹⁴⁴およびLys¹⁵⁸-Lys¹⁵⁹で切断されてACTH (1-15)およびACTH(16-24)も生じていた。更に、PACはD97LによりArg¹⁴³-Ser¹⁴⁴で切断されて、ヒト副腎皮質刺激ホルモン (1-24)は野生型OmpTプロテアーゼの場合の2.9倍遊離した。

他の部位で切断されて生じる副産物は遊離されなかった。融合タンパク質PCTは野生型OmpTプロテアーゼによりArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰及びArg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹で切断され、RRAR-CT及びRAR-CTを遊離した。PCTはD97HによりArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰、Arg¹⁴¹-Ala¹⁴²及びArg¹⁴³-Cys¹⁴⁴で切断されてRRAR-CT、AR-CT及びヒトカルシトニン前駆体を遊離した。いずれの融合タンパク質からも目的とする生理活性ポリペプチドが変異型OmpTプロテアーゼにより遊離されることが確認された。このことから本実施例で示したリンカーペプチド配列とOmpTプロテアーゼ変異体を利用した生理活性ポリペプチド生産系は特定の生理活性ポリペプチドに対してのみ利用できるというわけではなく、その汎用性は広いものと考えられる。

実施例17. 融合タンパク質PMTとOmpTプロテアーゼ変異体D97Mの

共発現

大腸菌で融合タンパク質を封入体として発現し、その宿主大腸菌が0mpTプロテアーゼを発現している場合には得られた封入体を尿素で溶解しただけで0mpTプロテアーゼによる切断を受ける。そこで0mpTプロテアーゼ欠損大腸菌株W3110 M25を宿主として融合タンパク質PMTの発現プラスミドpG117S4HomPMT（実施例9参照）と0mpTプロテアーゼ変異体D97Mを発現するプラスミドを共発現した場合にヒトモチリンが封入体溶解により遊離するかどうかを検討した。0mpTプロテアーゼ変異体D97Mを発現するプラスミドp0mpTD97MはpG117S4HomPMTと複製起点が同じであるため不和合である。

共発現を可能にするためにpMW218由来の0mpTプロテアーゼ変異体D97M発現プラスミド（図13）を以下のように構築した。プラスミドp0mpTD97M（実施例11参照）を鋳型としてXhoI及びHindIII制限酵素部位を含むプライマーを用いてPCRによりp0mpTD97MのラクトースプロモーターからtrpAターミネーターまでを増幅した。得られたDNA断片をXhoI及びHindIIIで消化後、pMW218をSalI及びHindIIIで消化したDNA断片に挿入してpMW218由来の0mpTプロテアーゼ変異体D97M発現プラスミドを作製した。W3110 M25モチリン融合タンパク質PMT生産菌（実施例9参照）を図13に示したpMW218由来の0mpTプロテアーゼ変異体D97M発現プラスミドで形質転換した。

このW3110 M25組換え大腸菌を2 L三角フラスコ中でテトラサイクリン10 mg/L及びカナマイシン20 mg/Lを含むLB液体培地400 mLを用いて37℃、1晩、旋回培養した。封入体の調製はすべて脱イオン水を用いて洗浄した以外は常法に従った。得られた封入体からのヒトモチリンの遊離反応は以下のように行った。10 M尿素160 μ Lに1 Mリン酸ナトリウム（pH 7.0）20 μ L、及び50 mM EDTA 16 μ Lを加え、融合タンパク質封入体（OD₆₆₀ = 100）80 μ Lを添加して、封入

体を溶解した。これに水を124 μ L加えて反応を開始した。

反応は25℃で行い、反応開始後20、40、60、120、180、240、300、360、1440分後にサンプリングしてSDS-PAGEによる分析に供した（図14）。分析の結果1440分間即ち24時間反応することにより融合タンパク質PMTがほぼ完全に分解されることがわかった。このことから実施例15のように0mpTプロテアーゼ変異体D97Mを発現するプラスミドp0mpTD97Mの形質転換大腸菌を用いた場合ほど迅速ではないが、反応時間を長くすることにより共発現菌から得られた封入体を溶解しただけでも融合タンパク質PMTの完全分解が可能であり、ヒトモチリンを遊離できることが示された。

実施例18. 融合タンパク質PMT、PMT6D、PMT7Dと0mpTプロテアーゼ変異体D97Mの反応

実施例14の結果から融合タンパク質PMTから0mpTプロテアーゼ変異体D97Mによりモチリンが生成することがわかったが、Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰でも切断されて副産物であるRRAR-motilinが生成した。一方、実施例8の結果から切断を所望しない部位のP3又はP4位に酸性アミノ酸であるアスパラギン酸を配することによりその部位での切断を抑えることができることが示された。

そこでモチリン融合タンパク質PMTのArg¹³⁹-Arg¹⁴⁰は切断を所望しない部位であるため、図15に示したモチリン融合タンパク質PMT6D、PMT7Dを発現する図10Aに示した構造を持つプラスミドを作製して、これらでW3110 M25大腸菌株を形質転換して、これらの融合タンパク質を封入体として回収し、これらの封入体を用いて、モチリン融合タンパク質濃度4 mg/mL（OD₆₆₀はおよそ20）、4 M 尿素、2 mM EDTA、50 mM リン酸ナトリウム、0mpTプロテアーゼ変異体D97M 0.52 mg/mL（OD₆₆₀は1）で25℃、2時間反応した。なお、封入体タンパク質濃度はHPLCにより以下のように測定した。6% 酢酸、2 M

尿素に封入体を $OD_{660}=1$ となるように添加して、 $10000\times g$ 、3分間遠心分離して上澄液 $50\ \mu L$ をYMC PROTEIN RPカラムに供した。HPLCはカラム温度 $40^{\circ}C$ 、流速 $1\ mL/min$ で行った。

40分間 0.1% トリフルオロ酢酸を含む $20-60\%$ アセトニトリルのリニアグラジエントにより溶出を行ない、 $220\ nm$ の吸収をモニターした。標準品として牛血清アルブミン(BSA)を用いて封入体タンパク質濃度を決定した。また、大腸菌の外膜画分中のOmpTプロテアーゼ変異体D97Mの懸濁液($OD_{660}=0.5$)をSDS-PAGEに供し、標準品として精製OmpTを用いて、デンストメーターにより変異体濃度を測定した。反応液をHPLCにより分析した結果を図16、17及び18に示した。モチリン融合タンパク質PMT、PMT6D、PMT7Dからそれぞれ 280 、 250 、 $370\ \mu g/mL$ のモチリンが遊離した。

また、それぞれから遊離したモチリン濃度を 100 とした場合の副産物AR-motilin ($Arg^{141}-Ala^{142}$ で切断されて生成)、RRAR-motilin ($Arg^{139}-Arg^{140}$ で切断されて生成)の濃度を図16～図18に示した。PMT (図16) では副産物がそれぞれ 2.8 、 33% 生成するのに対し、PMT6D (図17) では 3.5 、 16% となり、特にRRAR-motilinの生成が抑えられた。さらに、PMT7D (図18) ではRRAR-motilin由来のピークが検出されなかった。これは実施例8の結果に一致するものであり、OmpT変異体酵素を用いた場合にも、切断を所望しない部位のP3又はP4位に酸性アミノ酸であるアスパラギン酸を配することによりその部位での切断を抑えることができることがわかった。PMT7Dから最も多くモチリンが遊離した($370\ \mu g/mL$)が、これは副産物が生成しなかった分、モチリン遊離濃度が高くなったものと考えられる。

次に本発明に係る各種融合タンパク質のそれぞれの基本全アミノ酸配列を示す。

融合タンパク質PRR（配列番号：1；図1；実施例1～2、13）

PRRに係る配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Glu	135
Leu Arg Leu Tyr <u>Arg Arg</u> His His Gly Ser Gly Ser Pro Tyr Arg	150
His Pro Arg <u>His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser</u>	165
<u>Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val</u>	180
<u>Lys Gly Arg Gly</u>	184

上記のアミノ酸配列において、下線部はヒトグルカゴン様ペプチド-1（7-37）（GLP-1（7-37））のアミノ酸配列、2重下線部はOmpTプロテアーゼ切断部位である塩基性アミノ酸対（Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹）を示す。大腸菌のβ-ガラクトシダーゼのN末端117アミノ酸に由来する保護タンパク質（β-gal117S4H）はアミノ酸番号1のメチオニンからアミノ酸番号127のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。リンカーペプチドはアミノ酸番号128のグルタミンからアミノ酸番号153のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。

PA系融合タンパク質（配列番号：2；図2；実施例1～2）

PAに係る配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Ala Ala Ala Ala Ala	135
Ala Ala Ala Ala <u>Arg Arg</u> Ala Ala Ala Ala Gly Ser Pro Tyr Arg	150
His Pro Arg <u>His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser</u>	165
<u>Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val</u>	180
<u>Lys Gly Arg Gly</u>	184

上記のアミノ酸配列において、下線部はヒトグルカゴン様ペプチド-1（7-37）（GLP-1（7-37））のアミノ酸配列、2重下線部はOmpTプロテアーゼ切断部位である塩基性アミノ酸対（Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹）を示す。大腸菌のβ-ガラクトシダーゼのN末端117アミノ酸に由来する保護タンパク質（β-gal117S4H）はアミノ酸番号1のメチオニンからアミノ酸番号127のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。リンカーペプチドはアミノ酸番号128のグルタミンからアミノ酸番号153のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。

PA3'系融合タンパク質（配列番号：3；図2～3；実施例3～6

L

PA3' に係る配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Ala Ala Ala Ala Ala	135
Ala Ala Ala Ala <u>Arg Arg</u> Ala <u>Arg Ala</u> Ala Gly Ser Pro Tyr Arg	150
His Pro Arg <u>His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser</u>	165
<u>Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val</u>	180
<u>Lys Gly Arg Gly</u>	184

上記のアミノ酸配列において、下線部はヒトグルカゴン様ペプチド-1 (7-37) (GLP-1(7-37))のアミノ酸配列、2重下線部はOmpTプロテアーゼ切断部位(Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹及びArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴)を示す。大腸菌のβ-ガラクトシダーゼのN末端117アミノ酸に由来する保護タンパク質(β-gal117S4H)はアミノ酸番号1のメチオニンからアミノ酸番号127のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。リンカーペプチドはアミノ酸番号128のグルタミンからアミノ酸番号153のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。

PA23'系融合タンパク質（配列番号：4；図3～4；実施例5～8）

PA23' に係る配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Ala Ala Ala Ala Ala	135
Ala Ala Ala <u>Arg Arg Arg</u> Ala <u>Arg Ala</u> Ala Gly Ser Pro Tyr Arg	150
His Pro Arg <u>His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser</u>	165
<u>Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val</u>	180
<u>Lys Gly Arg Gly</u>	184

上記のアミノ酸配列において、下線部はヒトグルカゴン様ペプチド-1 (7-37) (GLP-1(7-37))のアミノ酸配列、2重下線部はOmpTプロテアーゼ切断部位(Arg¹³⁹-Arg¹⁴⁰、Arg¹⁴⁰-Arg¹⁴¹及びArg¹⁴³-Ala¹⁴⁴)を示す。大腸菌のβ-ガラクトシダーゼのN末端117アミノ酸に由来する保護タンパク質(β-gal117S4H)はアミノ酸番号1のメチオニンからアミノ酸番号127のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。リンカーペプチドはアミノ酸番号128のグルタミンからアミノ

酸番号153のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。

融合タンパク質PRMT (配列番号：5；図5；実施例9～10、14)

PRMT に係る配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Glu	135
Lue Arg Leu Tyr <u>Arg Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu</u>	150
<u>Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Gly Gln</u>	162

上記のアミノ酸配列において、下線部はヒトモチリンのアミノ酸配列、2重下線部は融合タンパク質PRRのOmpTプロテアーゼ切断部位P1位に相当するアルギニン(Arg¹⁴⁰)を示す。大腸菌のβ-ガラクトシダーゼのN末端117アミノ酸に由来する保護タンパク質(β-gal 117S4H)はアミノ酸番号1のメチオニンからアミノ酸番号127のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。リンカーペプチドはアミノ酸番号128のグルタミンからアミノ酸番号140のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。

融合タンパク質PMT（配列番号：6；図5；実施例9～10、14～15、17～18）

PMT に係る配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Ala Ala Ala Ala Ala	135
Ala Ala Ala Arg Arg Arg Ala Arg <u>Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr</u>	150
<u>Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Gly Gln</u>	165

上記のアミノ酸配列において、下線部はヒトモチリンのアミノ酸配列を示す。大腸菌の β -ガラクトシダーゼのN末端117アミノ酸に由来する保護タンパク質(β -gal117S4H)はアミノ酸番号1のメチオニンからアミノ酸番号127のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。リンカーペプチドはアミノ酸番号128のグルタミンからアミノ酸番号143のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。

融合タンパク質PAC（配列番号：7；図11；実施例16）

PAC に係る配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Ala Ala Ala Ala Ala	135
Ala Ala Ala Arg Arg Arg Ala Arg <u>Ser Tyr Ser Met Glu His Phe</u>	150
<u>Arg Trp Gly Lys Pro Val Gly Lys Lys Arg Arg Pro Val Lys Val</u>	165
<u>Tyr Pro</u>	167

上記のアミノ酸配列において、下線部はヒト副腎皮質刺激ホルモン（1-24）のアミノ酸配列を示す。大腸菌の β -ガラクトシダーゼのN末端117アミノ酸に由来する保護タンパク質（ β -gal117S4H）はアミノ酸番号1のメチオニンからアミノ酸番号127のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。リンカーペプチドはアミノ酸番号128のグルタミンからアミノ酸番号143のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。

融合タンパク質PCT（配列番号：8；図11；実施例16）

PCT に係る配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys	15
Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala	30
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr	45
Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg	60
Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu	75
Asp Leu Pro Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn	90
Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr	105
Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His	120
His His His Pro Gly Gly Arg Gln Met His Ala Ala Ala Ala Ala	135
Ala Ala Ala Arg Arg Arg Ala Arg <u>Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys</u>	150
<u>Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr Phe</u>	165
<u>Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro Gly</u>	176

上記のアミノ酸配列において、下線部はヒトカルシトニン前駆体のアミノ酸配列を示す。大腸菌の β -ガラクトシダーゼのN末端117アミノ酸に由来する保護タンパク質(β -gal117S4H)はアミノ酸番号1のメチオニンからアミノ酸番号127のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。リンカーペプチドはアミノ酸番号128のグルタミンからアミノ酸番号143のアルギニンまでのアミノ酸配列からなる。

請 求 の 範 囲

1. ポリペプチド中の所望する切断部位に係るP1位がアルギニン又はリジンであり、P1'位がアスパラギン酸、グルタミン酸又はプロリン以外であり、P10位からP3位まで又はP3'位からP5'位までのアミノ酸配列中の任意の部位に1つの塩基性アミノ酸又は2つ若しくは3つの塩基性アミノ酸を連続して配し（但し、1つの塩基性アミノ酸を配する場合、P6又はP4位を除く）、0mpTプロテアーゼを用いて当該ポリペプチド中の所望する切断部位で切断することを特徴とするポリペプチドの切断方法。

2. 所望する切断部位を介してC末端がアルギニン又はリジンである保護ペプチドと融合したN末端がアスパラギン酸、グルタミン酸又はプロリン以外である目的ペプチドからなる融合タンパク質中の当該切断部位に係るP10位からP3位まで又はP3'位からP5'位までのアミノ酸配列中の任意の部位に1つの塩基性アミノ酸又は2つ若しくは3つの塩基性アミノ酸を連続して配し（但し、1つの塩基性アミノ酸を配する場合、P6又はP4位を除く）、上記切断部位が0mpTプロテアーゼにより切断されうる切断部位である融合タンパク質をコードする遺伝子を有する発現プラスミドにより宿主細胞を形質転換し、当該細胞内において上記遺伝子を発現させ、上記切断部位において上記プロテアーゼで切断されることにより融合タンパク質から目的ペプチドを得ることを特徴とする目的ペプチドの製造方法。

3. ポリペプチド中又は融合タンパク質中に0mpTプロテアーゼによる切断を所望しない部位が存在する場合、当該部位に係るP3位に酸性アミノ酸を配することにより当該部位における切断を抑制することからなる請求項1又は2に記載の方法。

4. ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP10位～P3位の間に2又は3連続して塩基性アミノ酸を配することからなる請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

5. ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP5位～P3位に3連続して塩基性アミノ酸を配することからなる請求項4に記載の方法。

6. 塩基性アミノ酸がアルギニン及び／又はリジンである請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

7. 塩基性アミノ酸がアルギニンである請求項6項に記載の方法。

8. 0mpTプロテアーゼを用いて、ポリペプチド中の所望する切断部位で切断することからなるポリペプチドの切断方法又は融合タンパク質中の所望する切断部位で切断することからなる目的ペプチドの製造方法であって、当該ポリペプチド中又は当該融合タンパク質中に0mpTプロテアーゼによる切断を所望しない部位が存在する場合、当該部位に係るP3位に酸性アミノ酸を配することにより当該部位における切断を抑制することを特徴とする当該方法。

9. 酸性アミノ酸がアスパラギン酸である請求項3～8のいずれか1項に記載の方法。

10. ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP5位からP1位までのアミノ酸配列がArg-Arg-Arg-Ala-Argである請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

11. ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP7位からP1位までのアミノ酸配列がAsp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Argである請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

12. 0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオ

ニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンであるOmpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いてポリペプチド中の所望の切断部位で切断することを特徴とするポリペプチドの切断方法。

13. ポリペプチド中の所望する切断部位に係るP1位がアルギニン又はリジンであり、P1'位がアルギニン又はリジン以外である場合に、OmpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンであるOmpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いて当該ポリペプチド中の所望の切断部位で切断することを特徴とするポリペプチドの切断方法。

14. ポリペプチド中の所望する切断部位に係るP1位がアルギニン又はリジンであり、P1'位がアルギニン又はリジン以外であり、P10位からP3位まで又はP3'位からP5'位までのアミノ酸配列中の任意の部位に1つの塩基性アミノ酸又は2つ若しくは3つの塩基性アミノ酸を連続して配し、OmpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンであるOmpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いて当該ポリペプチド中の所望する切断部位で切断することを特徴とするポリペプチドの切断方法。

15. 所望する切断部位において、OmpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンであるOmpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体により切断されうる切断部位を介して保護ペプ

チドと融合した目的ペプチドからなる融合タンパク質をコードする遺伝子を有する発現プラスミドにより宿主細胞を形質転換し、当該細胞内において上記遺伝子を発現させ、上記切断部位において上記プロテアーゼで切断されることにより融合タンパク質から目的ペプチドを得ることを特徴とする目的ペプチドの製造方法。

16. 所望する切断部位において、0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体により切断されうる切断部位を介してC末端がアルギニン又はリジンである保護ペプチドと融合したN末端がアルギニン又はリジン以外である目的ペプチドからなる融合タンパク質をコードする遺伝子を有する発現プラスミドにより宿主細胞を形質転換し、当該細胞内において上記遺伝子を発現させ、上記切断部位において上記プロテアーゼで切断されることにより融合タンパク質から目的ペプチドを得ることを特徴とする目的ペプチドの製造方法。

17. 所望する切断部位を介してC末端がアルギニン又はリジンである保護ペプチドと融合したN末端がアルギニン又はリジン以外である目的ペプチドからなる融合タンパク質中の当該切断部位に係るP10位からP3位まで又はP3'位からP5'位までのアミノ酸配列中の任意の部位に1つの塩基性アミノ酸又は2つ若しくは3つの塩基性アミノ酸を連続して配し、上記切断部位が0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体により切断されうる切断部位である融合タンパク質をコードする遺伝子を有する発現プラスミドにより宿主細胞

を形質転換し、当該細胞内において上記遺伝子を発現させ、上記切断部位において上記プロテアーゼで切断されることにより融合タンパク質から目的ペプチドを得ることを特徴とする目的ペプチドの製造方法。

18. ポリペプチド中又は融合タンパク質中に0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体による切断を所望しない部位が存在する場合、当該部位に係るP3位に酸性アミノ酸を配することにより当該部位における切断を抑制することからなる請求項12～17のいずれか1項に記載の方法。

19. ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP10位～P3位の間に2又は3連続して塩基性アミノ酸を配することからなる請求項12～18のいずれか1項に記載の方法。

20. ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP5位～P3位に3連続して塩基性アミノ酸を配することからなる請求項19に記載の方法。

21. 塩基性アミノ酸がアルギニン及び／又はリジンである請求項14、17～20のいずれか1項に記載の方法。

22. 塩基性アミノ酸がアルギニンである請求項21に記載の方法。

23. 0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いて、ポリペプチド中の所望する切断部位で切断することからなるポリペプチドの切断方法又は融合タンパク質中の所望する切断部位で切断することからなる目的ペプチドの製造方法であって、当該ポリペプチド中又は当該融合タンパク質中に0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体による切断を所望しない部位が存在する場合、当該部位に係るP3位に酸性アミノ酸を配することにより当該部位における切断を抑制することを特徴とする当該方法。

24. 酸性アミノ酸がアスパラギン酸である請求項18～23のいずれ

か 1 項に記載の方法。

25. ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP5位からP1位までのアミノ酸配列がArg-Arg-Arg-Ala-Argである請求項12～24のいずれか 1 項に記載の方法。

26. ポリペプチド中又は融合タンパク質中の所望する切断部位に係るP7位からP1位までのアミノ酸配列がAsp-Ala-Arg-Arg-Arg-Ala-Argである請求項12～24のいずれか 1 項に記載の方法。

27. 0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸が、ロイシン、メチオニン又はヒスチジンである請求項12～26のいずれか 1 項に記載の方法。

28. ポリペプチド又は融合タンパク質中の所望の切断部位に係るP1' 位又は目的ペプチドのN末端がセリン又はアラニンであり、97番目のアミノ酸がロイシンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いる請求項12～26のいずれか 1 項に記載の方法。

29. ポリペプチド又は融合タンパク質中の所望の切断部位に係るP1' 位又は目的ペプチドのN末端がフェニルアラニン、アラニン、セリン、システイン又はチロシンであり、97番目のアミノ酸がメチオニンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いる請求項12～26のいずれか 1 項に記載の方法。

30. ポリペプチド又は融合タンパク質中の所望の切断部位に係るP1' 位又は目的ペプチドのN末端がアラニン、バリン、イソロイシン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン又はアスパラギンであり、97番目のアミノ酸がヒスチジンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体を用いる請求項12～26のいずれか 1 項に記載の方法。

31. 目的ペプチドが22残基から45残基のアミノ酸からなるペプチドである請求項 2 ～11、15～30のいずれか 1 項に記載の方法。

32. 目的ペプチドが、副腎皮質刺激ホルモン (1-24)、モチリン又はカルシトニン前駆体である請求項31記載の方法。

33. 宿主細胞が大腸菌である請求項 2 ～11、15～32のいずれか 1 項に記載の方法。

34. 0mpTプロテアーゼ又は0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸がアラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンである0mpTプロテアーゼ97番アミノ酸変異体をコードする遺伝子を発現する菌体そのものを切断用プロテアーゼとして用いることからなる請求項 1 ～33のいずれか 1 項に記載の方法。

35. 0mpTプロテアーゼ又は0mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸がアラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンである0mpTプロテアーゼ 9 7 番アミノ酸変異体をコードする遺伝子と当該プロテアーゼによる切断を所望するポリペプチド又は融合タンパク質をコードする遺伝子とを共発現することからなる請求項 1 ～33のいずれか 1 項に記載の方法。

Fig. 1

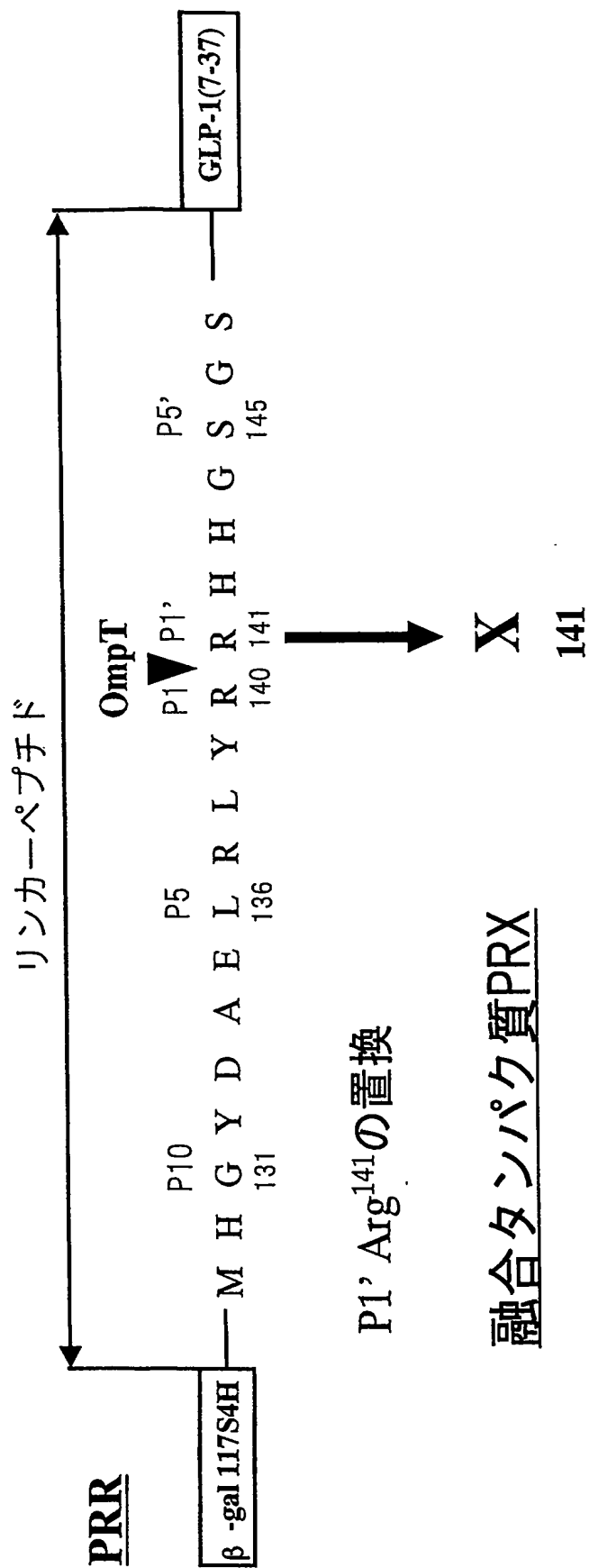
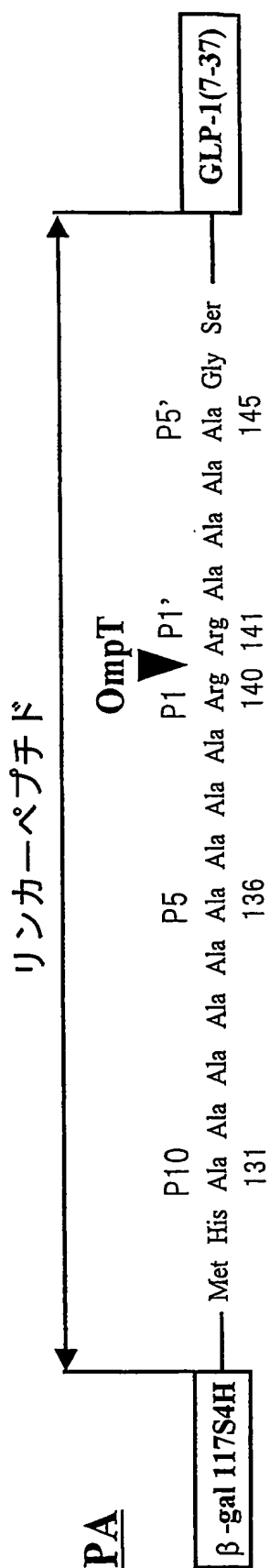

$$\frac{1}{17}$$

Fig. 2



Arg¹⁴⁰ ↓ Arg¹⁴¹ (%) における切断率

PA2	Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg↓Arg↑Arg Ala Ala Ala Ala	33 ^a
PPA3	Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Ala Arg↑Arg Ala Ala Ala Ala	380
PPA4	Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Ala Ala Arg↑Arg Ala Ala Ala Ala	480
PPA5	Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Ala Ala Arg↑Arg Ala Ala Ala Ala	260
PPA6	Ala Ala Ala Ala Ala Arg Ala Ala Ala Ala Arg↑Arg Ala Ala Ala Ala	360
PPA7	Ala Ala Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg↑Arg Ala Ala Ala Ala	310
PPA8	Ala Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg↑Arg Ala Ala Ala Ala	240
PPA9	Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg↑Arg Ala Ala Ala Ala	450
PPAI0	Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg↑Arg Ala Ala Ala Ala	330
PA2'	Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg↑Arg↑Arg Ala Ala Ala	29 ^b
PPA3'	Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg↑Arg Ala Arg↑Ala Ala	290 ^c
PPA4'	Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg↑Arg Ala Ala Arg Ala	240
PPA5'	Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg↑Arg Ala Ala Ala Arg	220

PAN

 $\frac{2}{17}$

உரித்
த

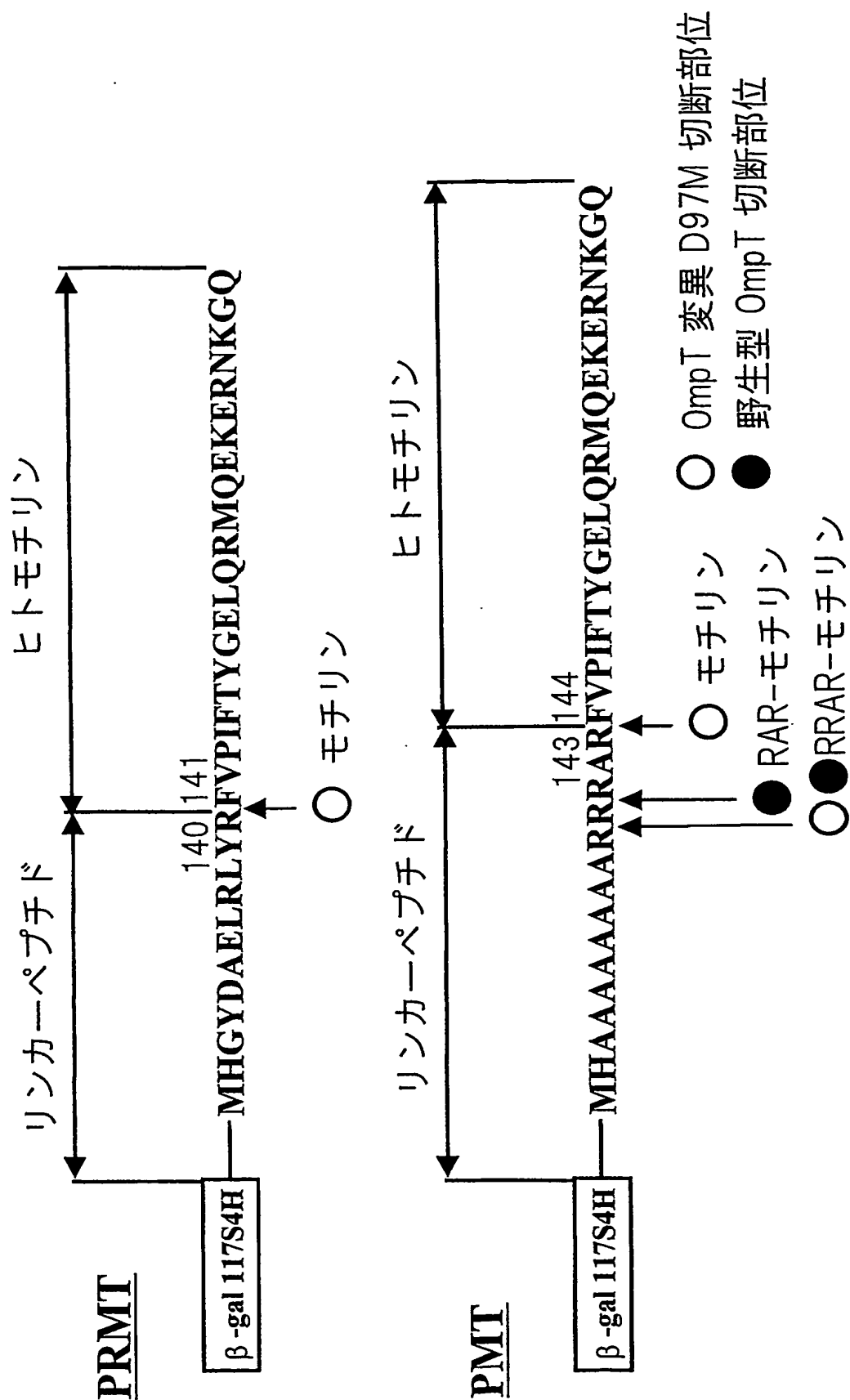


Fig.6

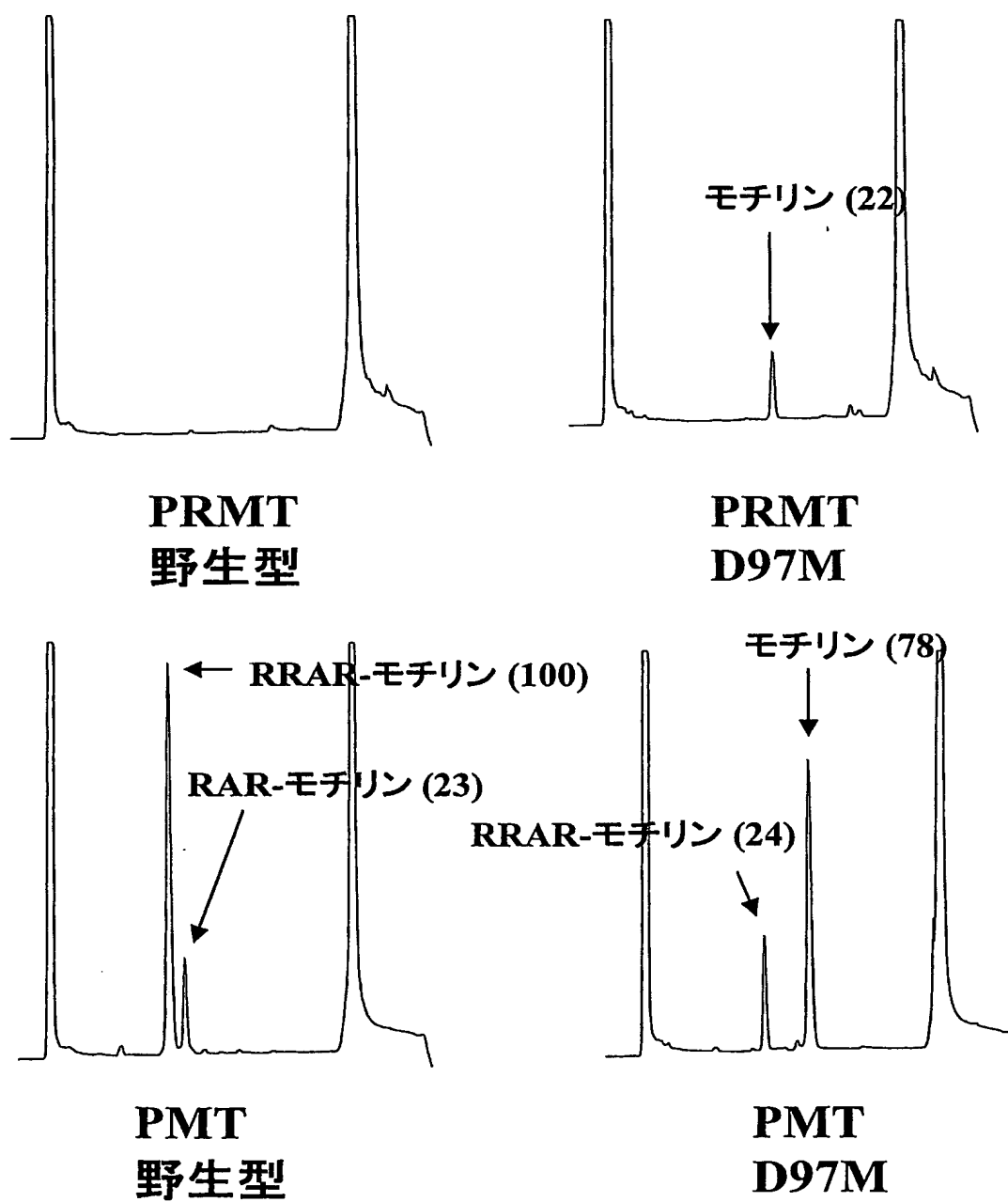


Fig.7

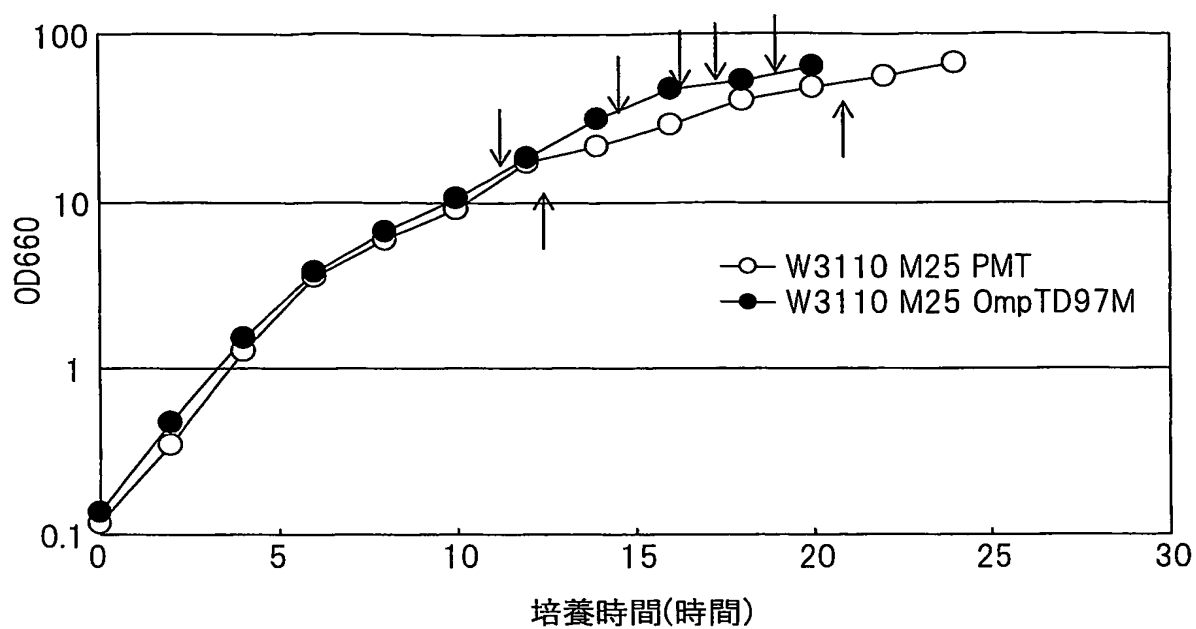


Fig.8

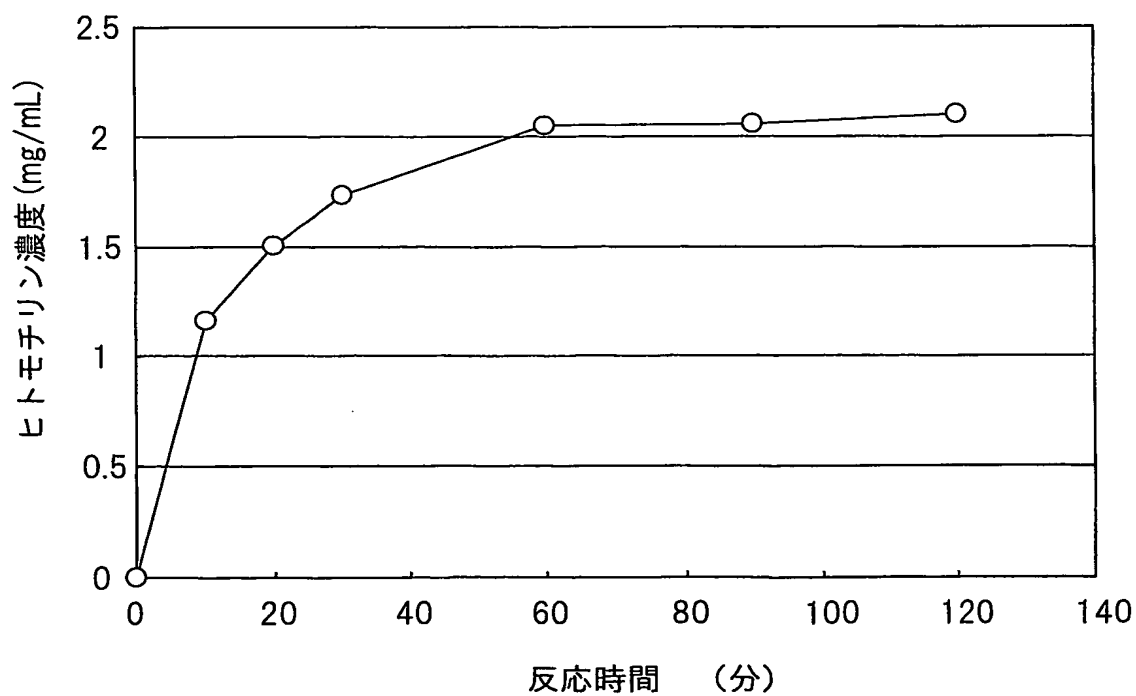


Fig.9

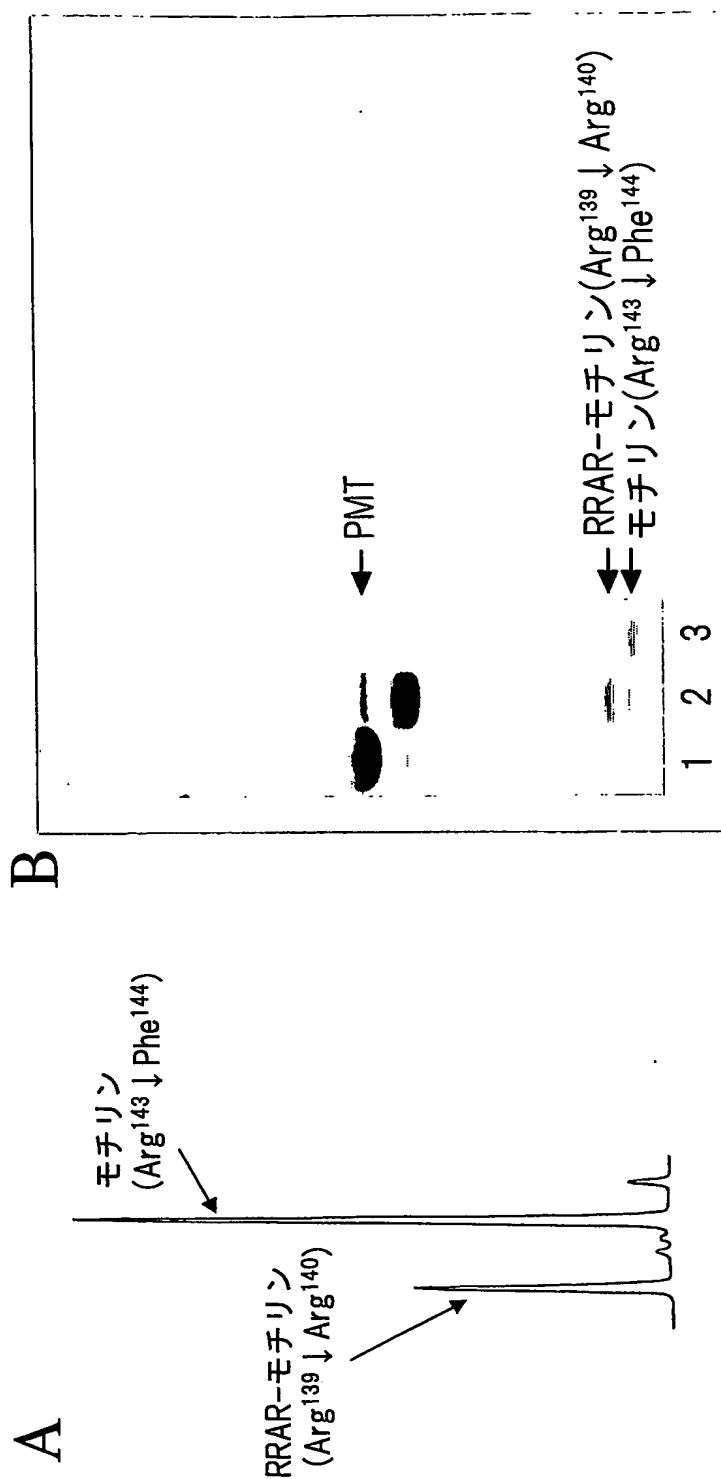


Fig.10

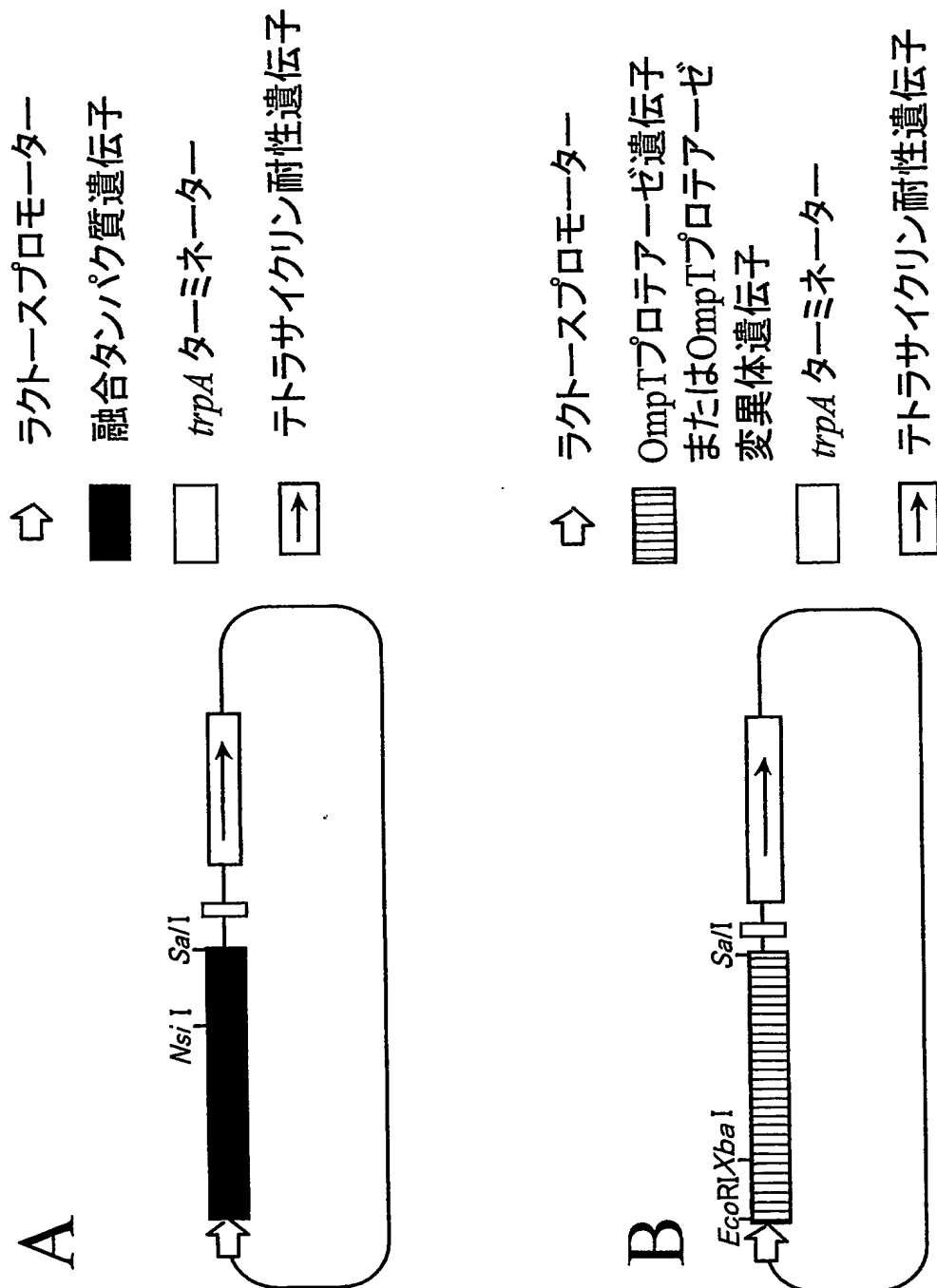


Fig.11

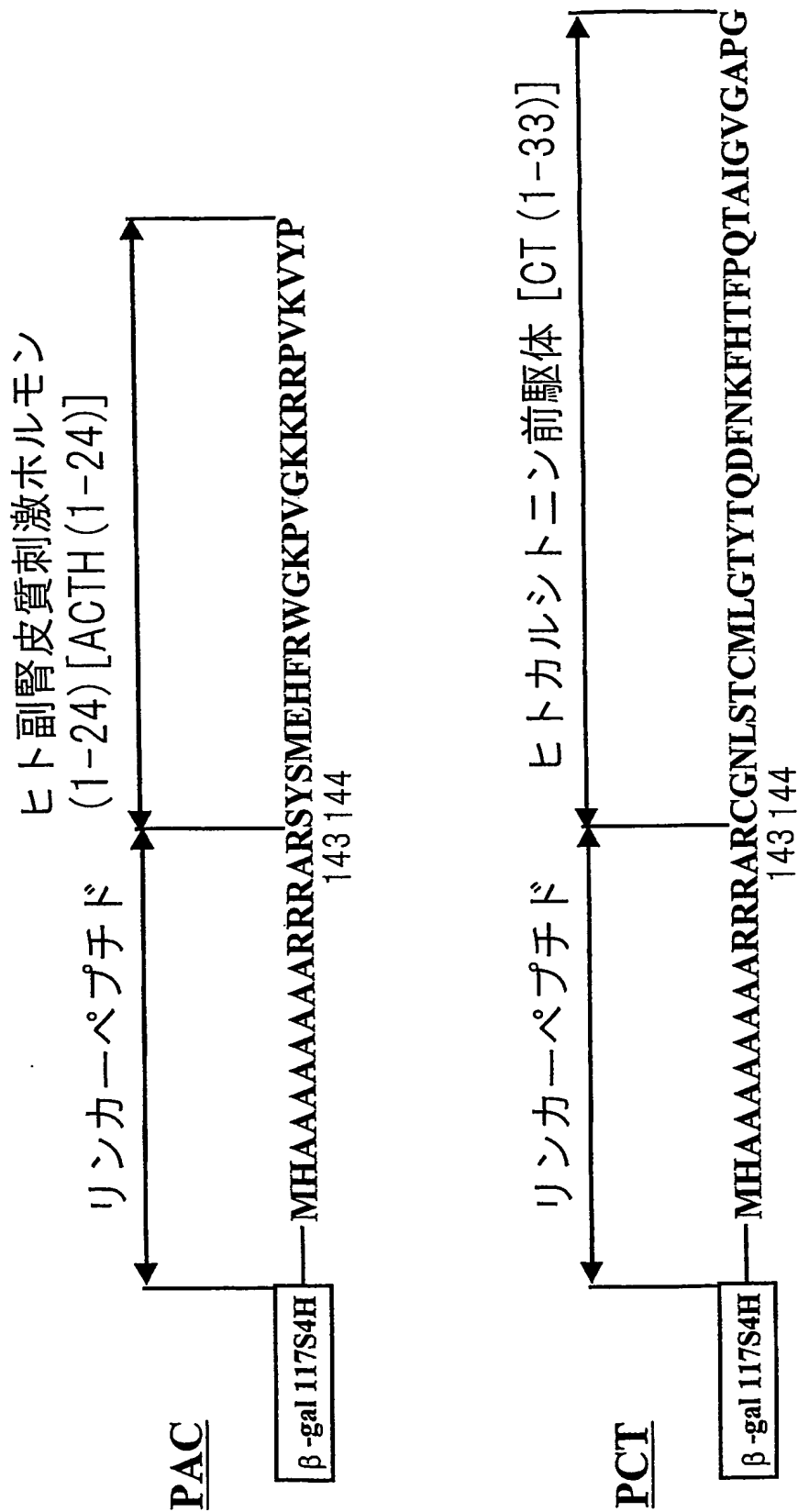


Fig.12

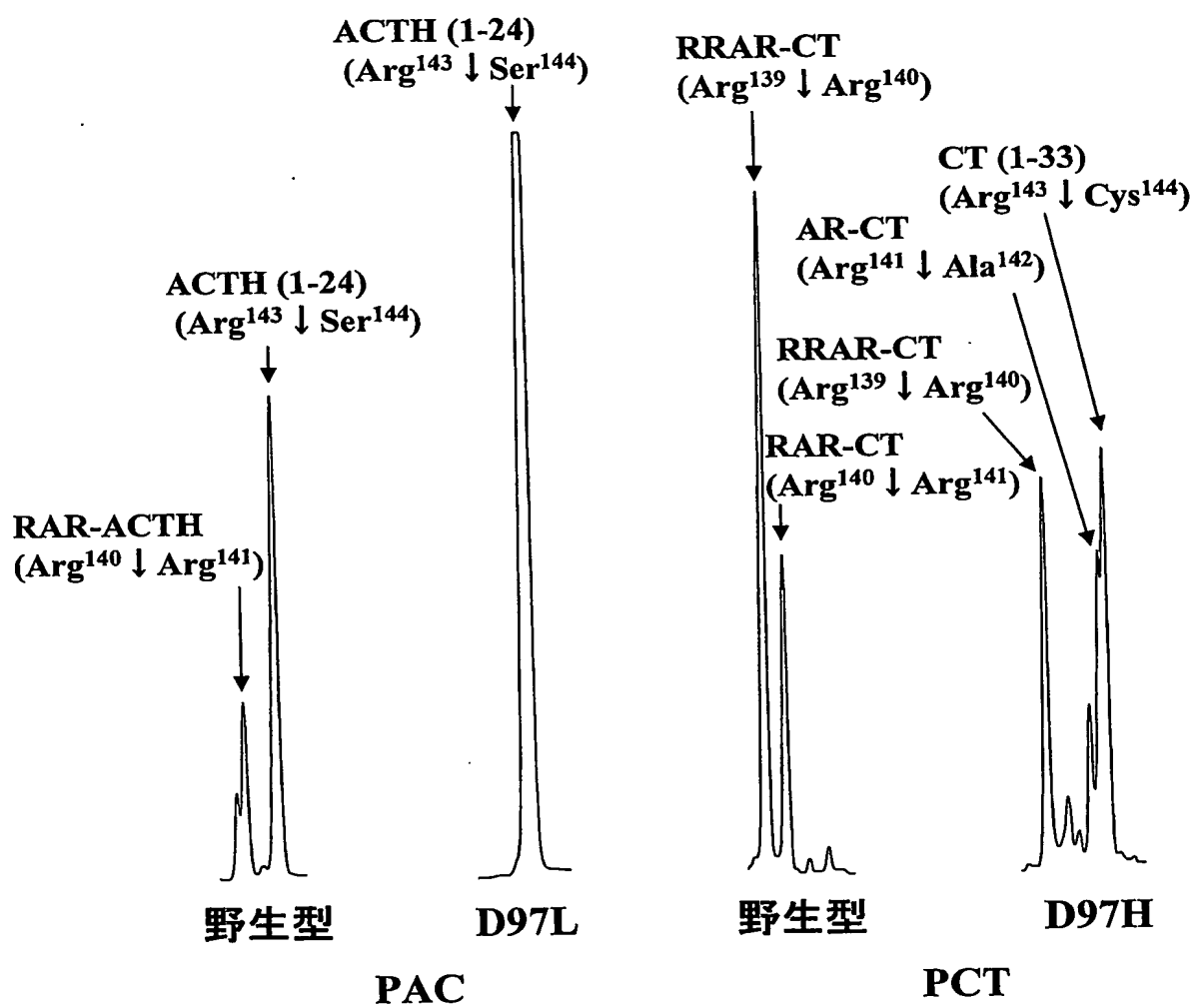


Fig.13

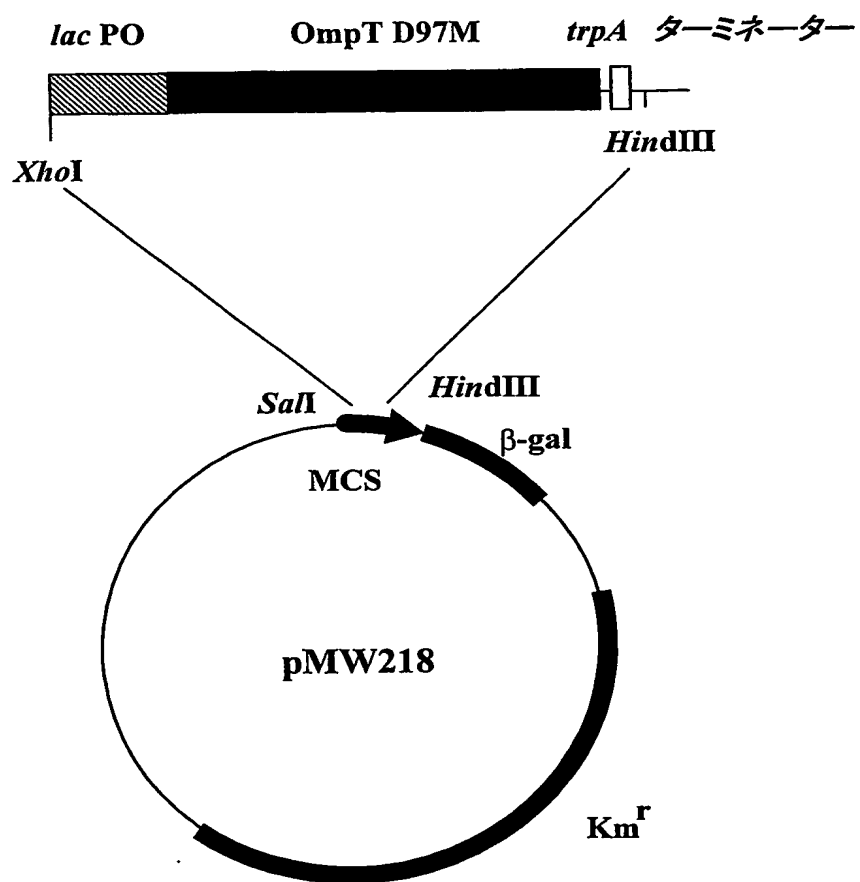


Fig.14

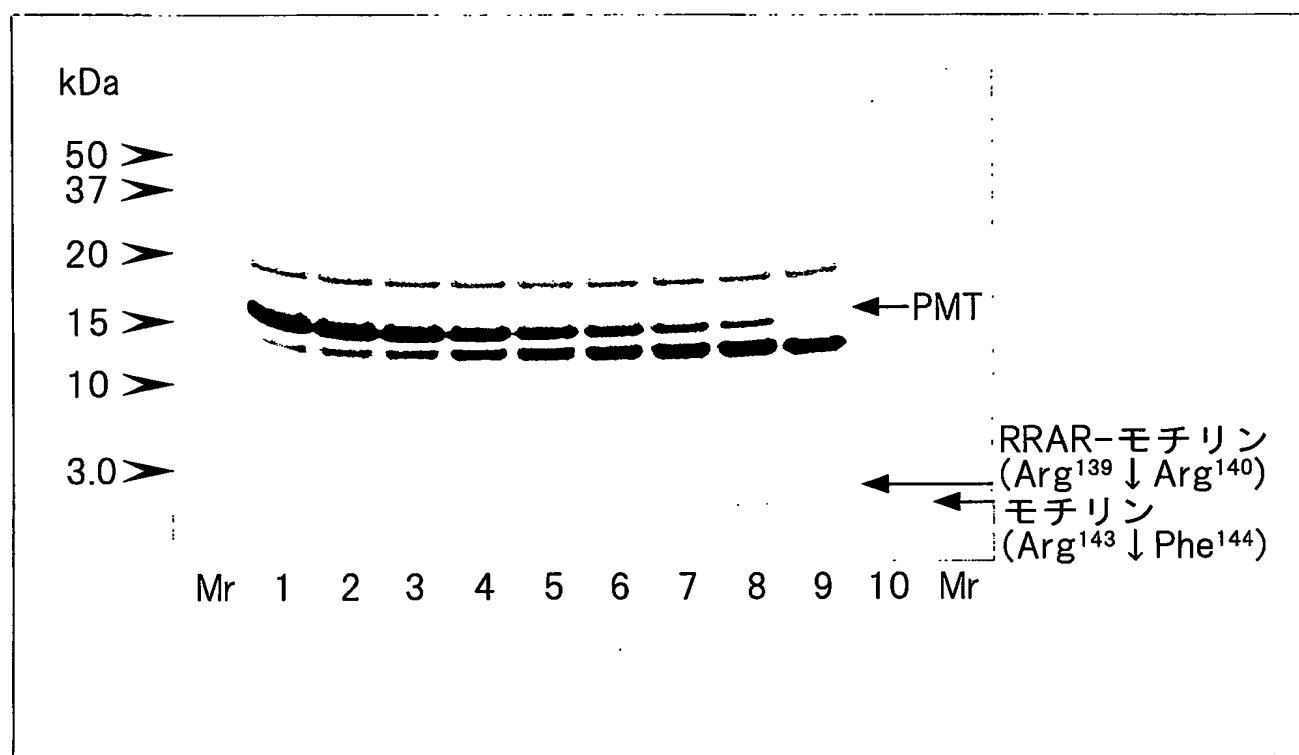


Fig.15

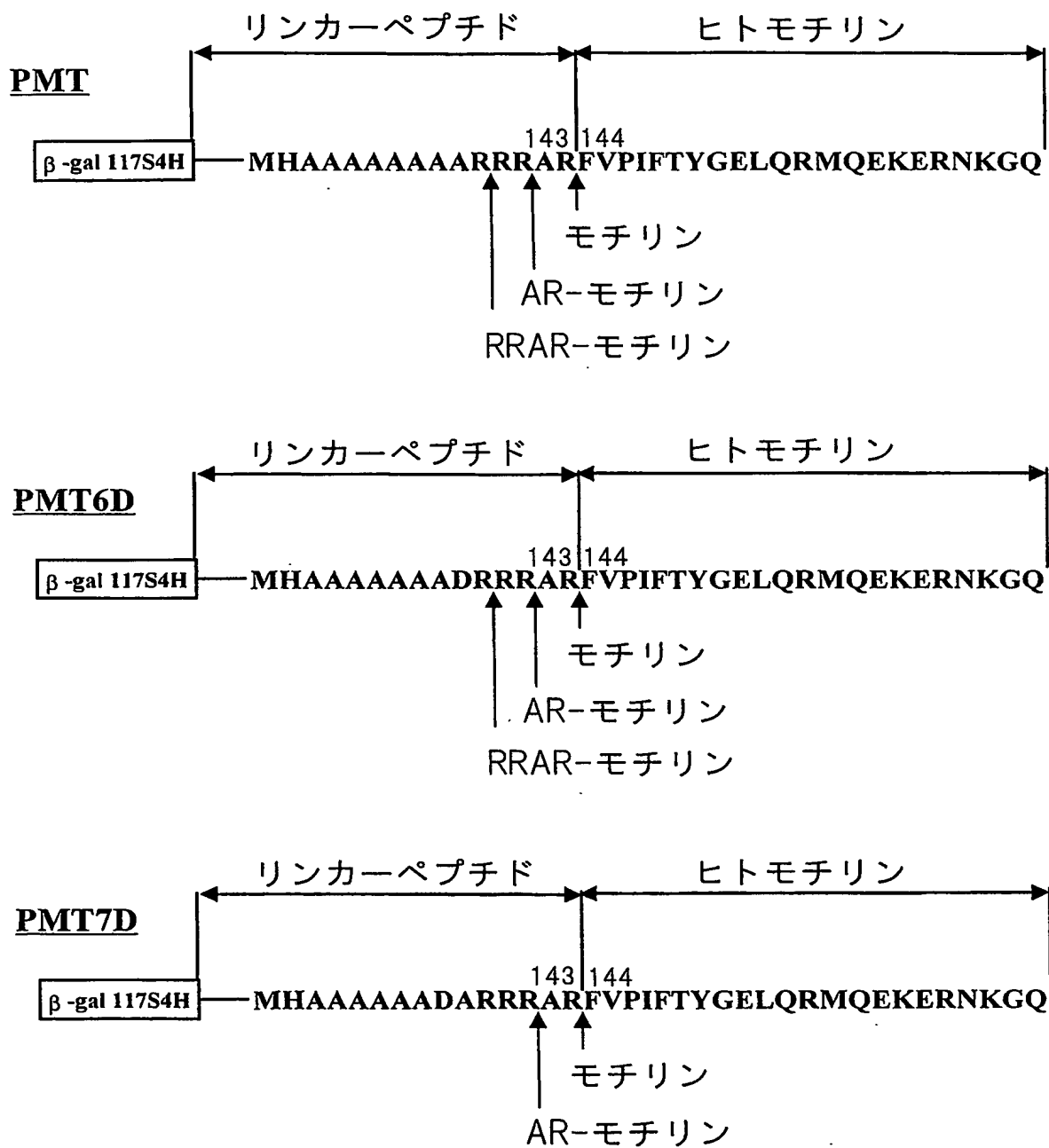


Fig.16

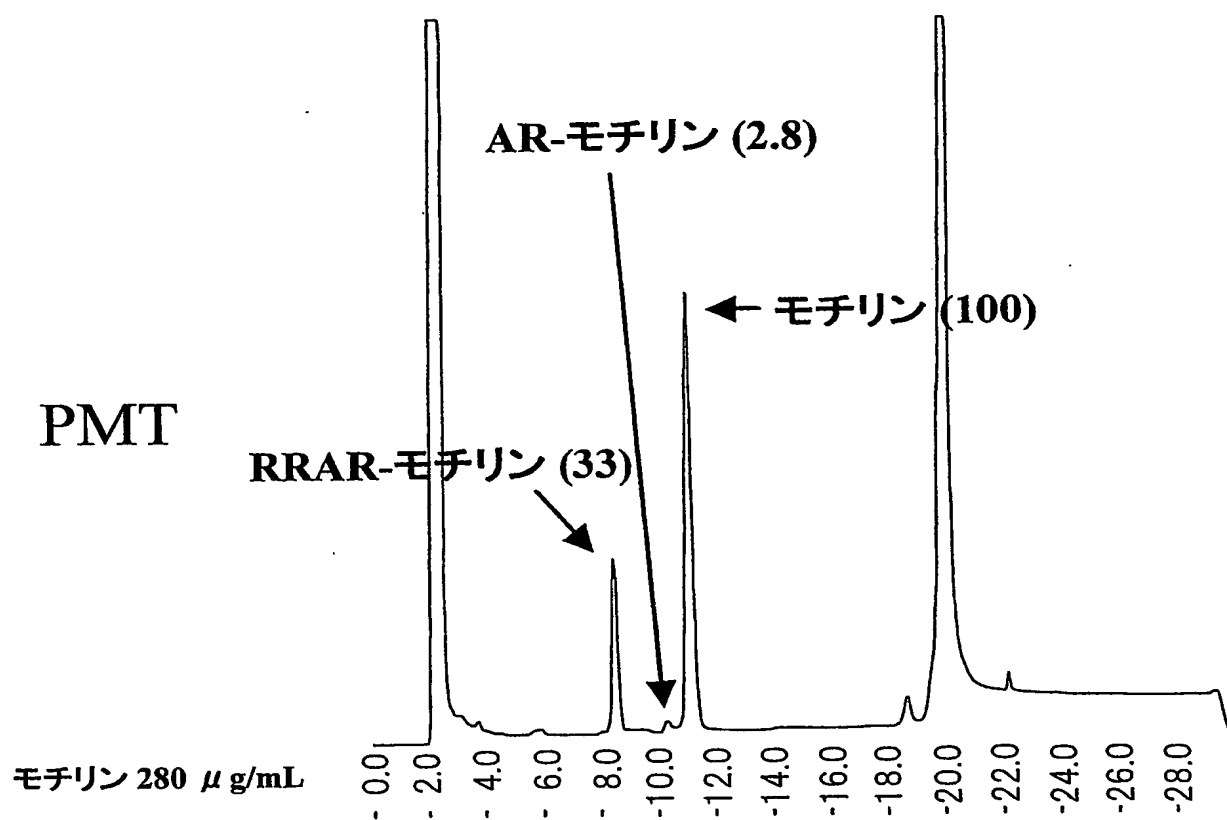


Fig.17

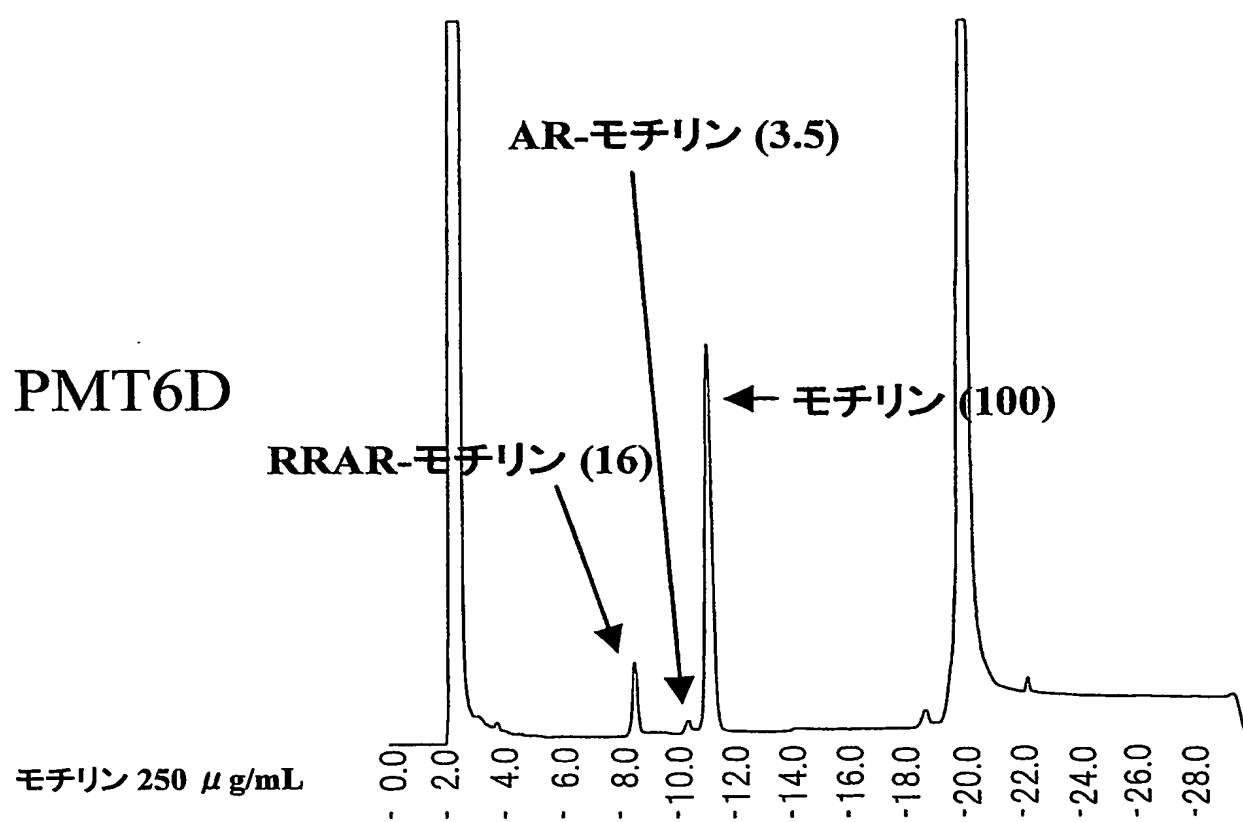
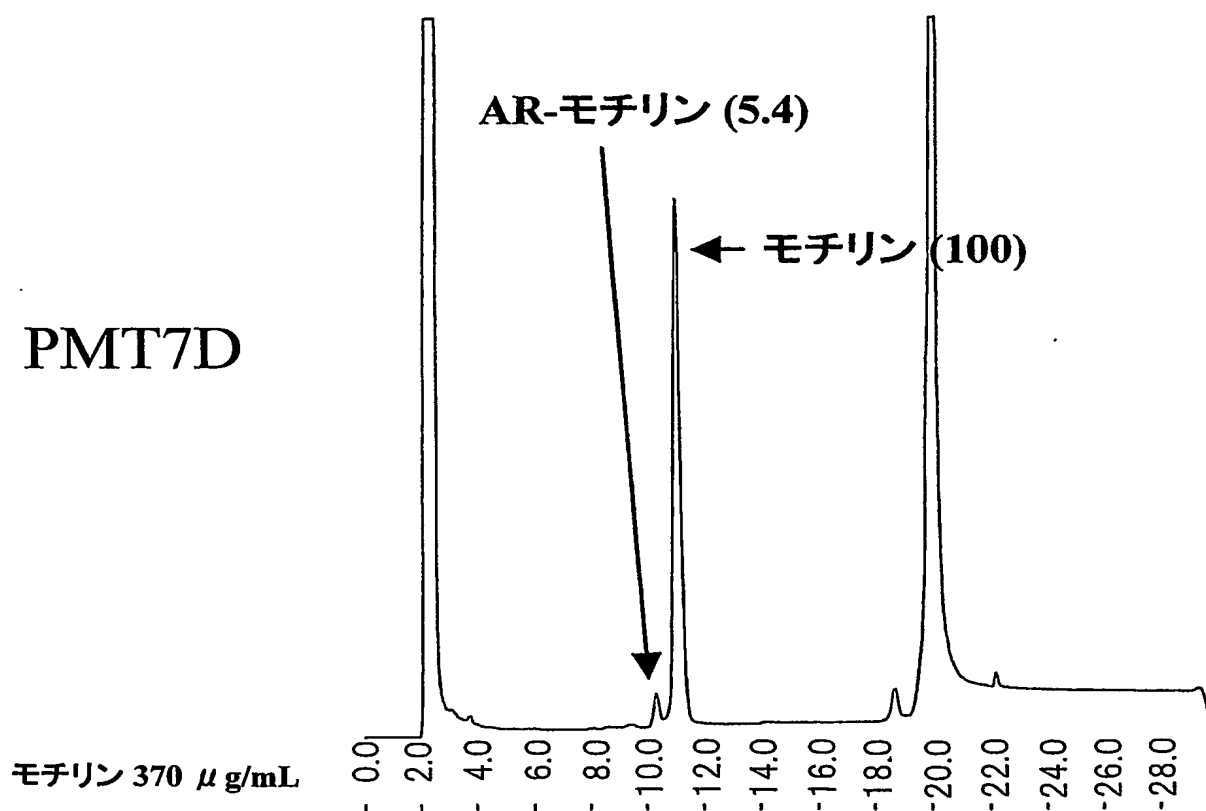


Fig.18



SEQUENCE LISTING

<110> Daiichi Suntory Pharma Co., LTD.

<120> Method for cleavage of polypeptide using OmpT protease variant

<130> P860

<160> 8

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Basic amino acid sequence of PRR fusion protein

<400> 1

```

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp
 1             5             10             15
Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
      20             25             30
Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
      35             40             45
Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
      50             55             60
Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Asp Leu Pro Glu Ala
65             70             75             80
Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
      85             90             95
Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro
      100            105            110
Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His Pro Gly Gly Arg Gln
      115            120            125
Met His Gly Tyr Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His Gly
      130            135            140
Ser Gly Ser Pro Tyr Arg His Pro Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr
      145            150            155            160
Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile
      165            170            175

```

Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

180

<210> 2

<211> 184

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Basic amino acid sequence of PA fusion protein

<400> 2

Met	Thr	Met	Ile	Thr	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Gln	Arg	Lys	Asp
1				5					10					15	
Trp	Glu	Asn	Pro	Gly	Val	Thr	Gln	Leu	Asn	Arg	Leu	Ala	Ala	His	Pro
		20					25						30		
Pro	Phe	Ala	Ser	Trp	Arg	Asn	Ser	Asp	Asp	Ala	Arg	Thr	Asp	Arg	Pro
		35				40					45				
Ser	Gln	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Asn	Gly	Glu	Trp	Arg	Phe	Ala	Trp	Phe
	50					55				60					
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Val	Pro	Glu	Ser	Leu	Leu	Asp	Leu	Pro	Glu	Ala
	65				70					75				80	
Asp	Thr	Val	Val	Val	Pro	Asp	Ser	Ser	Asn	Trp	Gln	Met	His	Gly	Tyr
			85						90					95	
Asp	Ala	Pro	Ile	Tyr	Thr	Asn	Val	Thr	Tyr	Pro	Ile	Thr	Val	Asn	Pro
		100						105					110		
Pro	Phe	Val	Pro	Thr	Glu	Pro	His	His	His	His	Pro	Gly	Gly	Arg	Gln
		115					120					125			
Met	His	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Ala
	130					135					140				
Ala	Gly	Ser	Pro	Tyr	Arg	His	Pro	Arg	His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr
	145				150					155				160	
Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly	Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile
			165					170					175		
Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly								
															180

<210> 3

<211> 184

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Basic amino acid sequence of PA3' type fusion protein

<400> 3

```

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp
 1             5             10             15
Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
      20             25             30
Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
      35             40             45
Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
 50             55             60
Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Asp Leu Pro Glu Ala
 65             70             75             80
Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
      85             90             95
Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro
      100            105            110
Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His Pro Gly Gly Arg Gln
      115            120            125
Met His Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Arg Ala Arg Ala
      130            135            140
Ala Gly Ser Pro Tyr Arg His Pro Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr
 145            150            155            160
Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile
      165            170            175
Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
      180

```

<210> 4

<211> 184

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Basic amino acid sequence of PA23' type fusion protein

<400> 4

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp
 1 5 10 15
 Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
 20 25 30
 Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
 35 40 45
 Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
 50 55 60
 Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Asp Leu Pro Glu Ala
 65 70 75 80
 Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
 85 90 95
 Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro
 100 105 110
 Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His Pro Gly Gly Arg Gln
 115 120 125
 Met His Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Arg Arg Ala Arg Ala
 130 135 140
 Ala Gly Ser Pro Tyr Arg His Pro Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr
 145 150 155 160
 Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile
 165 170 175
 Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 180

<210> 5

<211> 162

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Basic amino acid sequence of PRMT type fusion protein

<400> 5

```

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp
 1           5           10           15
Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
          20           25           30
Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
          35           40           45
Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
          50           55           60
Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Asp Leu Pro Glu Ala
          65           70           75           80
Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
          85           90           95
Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro
          100          105          110
Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His Pro Gly Gly Arg Gln
          115          120          125
Met His Gly Tyr Asp Ala Glu Lue Arg Leu Tyr Arg Phe Val Pro Ile
          130          135          140
Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys
          145          150          155          160
Gly Gln

```

<210> 6

<211> 165

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Basic amino acid sequence of PMT type fusion protein

<400> 6

```

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp
 1           5           10           15
Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
          20           25           30

```

Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
 35 40 45
 Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
 50 55 60
 Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Asp Leu Pro Glu Ala
 65 70 75 80
 Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
 85 90 95
 Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro
 100 105 110
 Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His Pro Gly Gly Arg Gln
 115 120 125
 Met His Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Arg Arg Ala Arg Phe
 130 135 140
 Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu
 145 150 155 160
 Arg Asn Lys Gly Gln
 165

<210> 7

<211> 167

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Basic amino acid sequence of PAC type fusion protein

<400> 7

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp
 1 5 10 15
 Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
 20 25 30
 Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
 35 40 45
 Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
 50 55 60
 Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Asp Leu Pro Glu Ala

65 70 75 80
 Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
 85 90 95
 Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro
 100 105 110
 Pro Phe Val Pro Thr Glu Pro His His His His Pro Gly Gly Arg Gln
 115 120 125
 Met His Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Arg Arg Arg Ala Arg Ser
 130 135 140
 Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val Gly Lys Lys Arg
 145 150 155 160
 Arg Pro Val Lys Val Tyr Pro
 165

<210> 8

<211> 176

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Basic amino acid sequence of PCT type fusion protein

<400> 8

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Lys Asp
 1 5 10 15
 Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
 20 25 30
 Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
 35 40 45
 Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
 50 55 60
 Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Asp Leu Pro Glu Ala
 65 70 75 80
 Asp Thr Val Val Val Pro Asp Ser Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
 85 90 95
 Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro
 100 105 110

Pro	Phe	Val	Pro	Thr	Glu	Pro	His	His	His	His	Pro	Gly	Gly	Arg	Gln
		115					120					125			
Met	His	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Arg	Ala	Arg	Cys
		130					135					140			
Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Thr	Tyr	Thr	Gln	Asp	Phe	Asn
145					150					155					160
Lys	Phe	His	Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Ala	Ile	Gly	Val	Gly	Ala	Pro	Gly
				165					170						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS),
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Kramer R.A. et al., Identification of essential acidic residues of outer membrane protease OmpT supports a novel active site, FEBS Lett, 2001, Vol.505, No.3, pages 426 to 430	12,15,27, 31-35/13-14, 16-17,21-22
Y	OKUNO K. et al., Substrate specificity at the P1' site of Escherichia coli OmpT under denaturing conditions, Biosci Biotechnol Biochem, 2002, Vol.66, No.1, pages 127 to 134	13-14,16-17, 21-22
A	Dekker N. et al., Substrate specificity of the integral membrane protease OmpT determined by spatially addressed peptide libraries, Biochemistry, 2001, Vol.40, No.6, pages 1694 to 1701	1-35

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 December, 2004 (13.12.04)

Date of mailing of the international search report
28 December, 2004 (28.12.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014704

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OKUNO K. et al., An analysis of target preferences of Escherichia coli outer-membrane endoprotease OmpT for use in therapeutic peptide production: efficient cleavage of substrates with basic amino acids at the P4 and P6 positions, Biotechnol. Appl. Biochem., 2002, Vol.36(Pt 2), pages 77 to 84	1-35
P,X	OKUNO K. et al., Utilization of Escherichia coli outer-membrane endoprotease OmpT variants as processing enzymes for production of peptides from designer fusion proteins, Appl. Environ. Microbiol., 2004 Jan, Vol.70, No.1, pages 76 to 86	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014704

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014704

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

(1) The inventions according to claims 1 to 7 and the parts relating to claims 1 to 7 in claims 9 to 11 and 31 to 35 relate to a method of cleaving a polypeptide at a desired cleavage site by using OmpT protease in the case where the amino acid at the P1-position of the desired cleavage site of the polypeptide is arginine or lysine, the amino acid at the P1'-position thereof is one other than aspartic acid, glutamic acid or proline, and one basic amino acid or two or three consecutive basic amino acids are located at an arbitrary part in the amino acid sequence of from P10- to P3-positions or from P3'- to P5'-positions (provided that in the case of having one basic amino acid, it is located at a position other than the P6- or P4-position).

(2) The inventions according to claims 8 and 23 and the parts relating to claims 8 and 23 in claims 9 to 11 and 24 to 35 relate to a method of cleaving a polypeptide or a fused protein at a desired cleavage site by using OmpT protease wherein, in the case where the polypeptide or the fused protein has a site not desired to be cleaved with OmpT protease, an acidic amino acid is located at the P3-position of the corresponding site.

(3) The inventions according to claims 12 and 15 and the parts relating to claims 12 and 15 in claims 18 to 22 and 25 to 35 relate to a method of cleaving a polypeptide at a desired cleavage site by using an OmpT protease mutant in which the amino acid at the 97th position from the N-end is alanine, leucine, phenylalanine, methionine, serine, threonine, cysteine, asparagine, glutamine, glutamic acid or histidine.

(4) The inventions according to claims 13 and 16 and the parts relating to claims 13 and 16 in claims 18 to 22 and 25 to 35 relate to a method of cleaving a polypeptide at a desired cleavage site by using an OmpT protease mutant in which the amino acid at the 97th position from the N-end is alanine, leucine, phenylalanine, methionine, serine, threonine, cysteine, asparagine, glutamine, glutamic acid or histidine, in the case where the amino acid at the P1-position of the desired cleavage site of the polypeptide is arginine or lysine and the amino acid at the P1'-position is one other than arginine or lysine.

(5) The inventions according to claims 14 and 17 and the parts relating to claims 14 and 17 in claims 18 to 22 and 25 to 35 relate to a method of cleaving a polypeptide at a desired cleavage site by using an OmpT protease mutant in which the amino acid at the 97th position from the N-end is alanine, leucine, phenylalanine, methionine, serine, threonine, cysteine, asparagine, glutamine, glutamic acid or histidine, in the case where the amino acid at the P1-position of the desired cleavage site of the polypeptide is arginine or lysine, the amino acid at the P1'-position is one other than arginine or lysine, and one, two or three basic amino acids are located at an arbitrary part in the amino acid sequence of from P10- to P3-positions or from P3'- to P5'-positions.

(continued to next page)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014704

However, there has been publicly known a method of cleaving a polypeptide at a desired cleavage site by using OmpT protease, in the case where the amino acid at the P1-position of the desired cleavage site is arginine or lysine, the amino acid at the P1'-position is one other than arginine or lysine, and one, two or three basic amino acids are located at an arbitrary part in the amino acid sequence of from P10- to P3-positions or from P3'- to P5'-positions, as reported in Biosci. Biotechnol. Biochem., 2002, Vol.66, No.1, pp.127-134. Also, there has been publicly known a method of cleaving a polypeptide at a desired cleavage site by using a mutant of mpT protease having a mutation at the amino acid at the 97th position from the N-end, as reported in FEBS Letters, 2001, Vol.505, pp.426-430. Thus, none of the matters common to any of the above items (1) to (5) can be considered as a special technical feature.

Such being the case, the inventions as claimed in the claims of the present case have five groups of inventions.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	Kramer R. A. et al., Identification of essential acidic residues of outer membrane protease OmpT supports a novel active site, FEBS Lett, 2001, Vol.505, No.3, pp.426-430	12, 15, 27, 31-35/13-14, 16-17, 21-22
Y	Okuno K. et al., Substrate specificity at the P1' site of Escherichia coli OmpT under denaturing conditions, Biosci Biotechnol Biochem, 2002, Vol.66, No.1, pp.127-134	13-14, 16-17, 21-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.12.2004

国際調査報告の発送日

28.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

飯室 里美

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Dekker N. et al., Substrate specificity of the integral membrane protease OmpT determined by spatially addressed peptide libraries, Biochemistry, 2001, Vol. 40, No. 6, pp. 1694-1701	1-35
A	Okuno K. et al., An analysis of target preferences of Escherichia coli outer-membrane endoprotease OmpT for use in therapeutic peptide production: efficient cleavage of substrates with basic amino acids at the P4 and P6 positions, Biotechnol Appl Biochem, 2002, Vol. 36 (Pt 2) pp. 77-84	1-35
PX	Okuno K. et al., Utilization of Escherichia coli outer-membrane endoprotease OmpT variants as processing enzymes for production of peptides from designer fusion proteins, Appl Environ Microbiol, 2004 Jan, Vol. 70, No. 1, pp. 76-86	1-35

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
（特別ページ）参照

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(1) 請求の範囲1-7、及び、請求の範囲9-11, 31-35のうち請求の範囲1-7に関する部分は、ポリペプチド中の所望の切断部位のP1位がアルギニン又はリジンであり、P1'位がアスパラギン酸、グルタミン酸又はプロリン以外で、P10位からP3位まで又はP3'位からP5'位までのアミノ酸配列中の任意の部位に1つ又は2つ若しくは3つの塩基性アミノ酸を配し（但し、1つの塩基性アミノ酸を配する場合、P6又はP4位を除く）、OmpTプロテアーゼを用いて、所望の切断部位でポリペプチドを切断する方法に係る発明である。

(2) 請求の範囲8, 23、及び、請求の範囲9-11, 24-35のうち請求の範囲8, 23に関する部分は、OmpTプロテアーゼを用いて、ポリペプチド又は融合タンパク質中の所望の切断部位で切断する方法であって、当該ポリペプチド又は融合タンパク質中に、OmpTプロテアーゼによる切断を所望しない部位が存在する場合は、当該部位に係るP3位に酸性アミノ酸を配する方法に係る発明である。

(3) 請求の範囲12, 15、及び、請求の範囲18-22, 25-35のうち請求の範囲12, 15に関する部分は、N末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンであるOmpTプロテアーゼ変異体を用いてポリペプチド中の所望の切断部位で切断する方法に係る発明である。

(4) 請求の範囲13, 16、及び、請求の範囲18-22, 25-35のうち請求の範囲13, 16に関する部分は、ポリペプチド中の所望の切断部位のP1位がアルギニン又はリジンであり、P1'位がアルギニン又はリジン以外で、N末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンであるOmpTプロテアーゼ変異体を用いてポリペプチド中の所望の切断部位で切断する方法に係る発明である。

(5) 請求の範囲14, 17、及び、請求の範囲18-22, 25-35のうち請求の範囲14, 17に関する部分は、ポリペプチド中の所望の切断部位のP1位がアルギニン又はリジンであり、P1'位がアルギニン又はリジン以外で、P10位からP3位まで又はP3'位からP5'位までのアミノ酸配列中の任意の部位に1つ又は2つ若しくは3つの塩基性アミノ酸を配し、N末端から97番目のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸又はヒスチジンであるOmpTプロテアーゼ変異体を用いてポリペプチド中の所望の切断部位で切断する方法に係る発明である。

しかしながら、「Biosci. Biotechnol. Biochem., 2002, Vol. 66, No. 1, pp. 127-134」に記載されるように、OmpTプロテアーゼを用いて、ポリペプチド中の所望の切断部位で切断する方法であって、その切断部位のP1がアルギニン又はリジンであり、P1'位がアルギニン又はリジン以外であり、P10位からP3位まで又はP3'位からP5'位までのアミノ酸配列中の任意の部位に1つ又は2つ若しくは3つの塩基性アミノ酸を配している方法は公知であるし、「FEBS Letters, 2001, Vol. 505, pp. 426-430」に記載されるように、mpTプロテアーゼのN末端から97番目のアミノ酸における変異体を用いて、ポリペプチド中の所望の切断部位で切断する方法も公知であるから、上記発明(1)～(5)のいずれの間で共通する事項も、特別な技術的特徴であるとは言えない。

よって、本出願の請求の範囲に記載された発明には、5発明が包含されている。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.